

VYSOKÁ ŠKOLA BÁŇSKÁ – TECHNICKÁ UNIVERZITA OSTRAVA

Hornicko-geologická fakulta

Katedra environmentálního inženýrství



Biodegradace biomateriálu ze směsí PLA/PHB v podmínkách *in-vitro*

Biodegradation of Biomaterials from PLA/PHB Blends in Conditions *in-vitro*

Diplomová práce

Autor:

Bc. Jana Hofmanová

Vedoucí diplomové práce:

doc. Mgr. Hana Vojtková, Ph.D.

Odborný konzultant:

doc. Ing. Radovan Hudák, Ph.D.

Ostrava 2019

Zadání diplomové práce

Student: **Bc. Jana Hofmanová**
Studijní program: N2102 Nerostné suroviny
Studijní obor: 3904T029 Minerální biotechnologie
Téma: Biodegradace biomateriálů ze směsí PLA/PHB v podmínkách in-vitro
Biodegradation of Biomaterials from PLA/PHB Blends in Conditions
in-vitro
Jazyk vypracování: čeština

Zásady pro vypracování:

1. Úvod a cíl práce
2. Biomateriály, jejich složení a funkce v lidském těle, možnosti jejich realizace pomocí 3D tisku
3. Příčiny a důsledky biodegradace biomateriálů (scaffoldů)
4. Experimentální část práce – experimentální biodegradace zvoleného biomateriálu
5. Výsledky a jejich diskuse
6. Závěr

Seznam doporučené odborné literatury:

ABDELWAHAB, M. A., A. FLYNN, B. S. CHIOU, I. SEYD, W. ORTS a E. CHIELLINI. Thermal, mechanical and morphological characterization of plasticized PLA-PHB blends. *Polymer Degradation and Stability*. 2012, roč. 97, č. 9, s. 1822-1828. ISSN 0141-3910
AGRAWAL, C. M. Reconstructing the human body using biomaterials. *JOM – The Journal of The Minerals, Metals & Materials Society*. 1998, roč. 50, č. 1, s. 31-35. ISSN 1543-1851
LAM, C. X., X. MO, S. H. TEOH, a D. W. HUTMACHER. Scaffold development using 3D printing with a starch-based polymer. *Materials Science and Engineering*. 2002, roč. 20, č. 1-2, s. 49-56, ISSN 0928-4931
WALLACH-KLOSKI, L. a N. KLOSKI. *Začínáme s 3D tiskem: Praktická příručka k hardwaru i softwaru k ovládnutí 3D tisku*. Computer Press, 2017. 216 s. ISBN 978-80-251-4876-1

Formální náležitosti a rozsah diplomové práce stanoví pokyny pro vypracování zveřejněné na webových stránkách fakulty.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Mgr. Hana Vojtková, Ph.D.**

Datum zadání: 31.10.2018

Datum odevzdání: 30.04.2019




doc. Ing. Silvie Heviánková, Ph.D.
vedoucí institutu


prof. Ing. Vladimír Slivka, CSc., dr.h.c.
děkan fakulty

Prohlášení autora diplomové práce

Celou diplomovou práci včetně příloh, jsem vypracovala samostatně a uvedla jsem všechny použité podklady a literaturu. Byla jsem seznámena s tím, že na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č.121/2000 Sb. – autorský zákon, zejména § 35 – využití díla v rámci občanských a náboženských obřadů, v rámci školních představení a využití díla školního a § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava (dále jen VŠB – TUO) má právo nevýdělečně, ke své vnitřní potřebě, diplomovou práci užít (§ 35 odst. 3).

Souhlasím s tím, že jeden výtisk bude uložen u vedoucího diplomové práce. Souhlasím s tím, že údaje o diplomové práci, obsažené v Záznamu o závěrečné práci, umístěném v příloze mé diplomové práce, budou zveřejněny v informačním systému VŠB – TUO.

Souhlasím s tím, že diplomová práce je licencována pod Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported licencí. Pro zobrazení kopie této licence, je možno navštívit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>.

Bylo sjednáno, že s VŠB – TUO, v případě zájmu o komerční využití z její strany, uzavřu licenční smlouvu s oprávněním užít dílo v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona.

Bylo sjednáno, že užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu komerčnímu využití mohu jen se souhlasem VŠB – TUO, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly VŠB – TUO na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše).

V Ostravě dne 30.4.2019



Bc. Jana Hofmanová

Poděkování

Vědomosti a čas jsou to nejcennější, co může jeden člověk druhému dát. Při psaní této práce jsem zjistila, že je nemožné napsat hodnotnou studii bez přístupu do laboratoří, kvalitního přístrojového vybavení a dobrých rad školitelů. Je tedy mou milou povinností při této příležitosti poděkovat všem, kteří mi pomohli při tvorbě mé diplomové práce.

Předně bych chtěla vyjádřit poděkování vedoucí mé diplomové práce paní doc. Mgr. Haně Vojtkové, Ph.D., za odbornou pomoc, ochotu a čas, který mi věnovala při průběžných konzultacích. Také bych chtěla moc poděkovat panu doc. Ing. Radovanovi Hudákovi, Ph.D., který byl mým odborným konzultantem, za cenné rady a poskytnutý materiál pro mou studii pod záštitou Technické University v Košicích, které rovněž patří velké díky. Děkuji také paní Ing. Aleně Findrik Balogové, Ph.D., která mě seznámila s problematikou 3D biotisku a pomohla mi s přípravou testovacích vzorků. Velké poděkování patří rovněž paní doc. RNDr. Marianně Trebuňové, Ph.D., která mi pomohla s testováním přirozené biodegradability. Děkuji také paní doc. Ing. Lucy Vojtové, Ph.D. z CEITEC, za čas a cenné rady týkající se biodegradace. Mé poděkování patří rozhodně paní Jarmile Bílské za rady a asistenci v laboratoři při experimentu akcelerované biodegradace a také panu Dr. Ing. Daliborovi Matýskovi za nafocení vzorků na skenovacím elektronovém mikroskopu. Mé poděkování patří také paní Ing. Zuzaně Konvičkové a paní Ing. Sarah Janštové za podporu, přístup a velkou ochotu, kterou mi obě věnovaly.

Rovněž bych chtěla poděkovat firmě PrimeCell Bioscience a.s. za možnost absolvování stáže, která mě seznámila s problematikou 3D tisku. Chtěla bych poděkovat panu doc. Ing. Bohumilu Horákovi, Ph.D. za ochotu a postrčení správným směrem v mé budoucí kariéře. Mé poděkování směřuje také paní doktorce MUDr. Anežce Dědkové za přínosné lékařské rady, bez kterých by se má práce neobešla.

Závěrem bych touto cestou chtěla poděkovat především mé rodině, mamince a tatínkovi, bez jejichž podpory po dobu mého studia, a hlavně v posledním roce by tato práce nevznikla. Děkuji také svým přátelům za podporu, pomoc a shovívavost v těchto perných měsících. A děkuji hlavně svému příteli Jiřímu, který mě na mé akademické cestě podporoval a byl mi oporou, tato práce je věnována zejména jemu.

Anotace

Diplomová práce pojednává o problematice biodegradace biomateriálů v podmínkách *in-vitro*. Biomateriály jsou systémově a farmakologicky inertní substance určené k implantaci nebo začlenění do živého systému. V práci jsou popsány různé druhy biomateriálů, které se dají využít jako implantáty a také možnost využití 3D biotisku jako budoucí metody k urychlení jejich výroby a tím pádem zkrácení doby čekání pro pacienty. V experimentální části je testována schopnost směsí na bázi polymléčné kyseliny a polyhydroxybutyrátu s přídavkem změkčovadla triacetin biodegradovat v simulovaných podmínkách lidského těla, tedy roztocích o pH 4,5 – 7,2 při 37 °C. Experimenty byly provedeny s využitím akcelerované a přirozené biodegradace a na základě výsledků bylo potvrzeno, že daný biomateriál je v těchto podmínkách schopen biodegradovat.

Klíčová slova

3D biotisk, biodegradace, biomateriál, kyselina polymléčná, polyhydroxybutyrát, scaffold

Annotation

The thesis deals with the issue of biodegradation of biomaterials in conditions *in-vitro*. Biomaterials are systemically and pharmacologically inert substances intended for implantation or integration into the living system. The thesis describes various types of biomaterials that can be used as implants and the possibility of using 3D bioprint as a future method to accelerate their production and thus shorten the waiting time for patients. In the experimental part, the ability of blends based on polylactic acid and polyhydroxybutyrate with the addition of plasticizer triacetin is tested for biodegradation in simulated conditions of the human body, i.e. solutions with pH 4.5 – 7.2 at 37 °C. Experiments were performed using accelerated and natural biodegradation. Based on these results, it was confirmed that the biomaterial was biodegradable under these conditions.

Key words

3D bioprinting, biodegradation, biomaterial, polylactic acid, polyhydroxybutyrate, scaffold

OBSAH

1	Úvod a cíl práce.....	1
2	Biomateriály, jejich složení a funkce, možnosti jejich realizace pomocí 3D tisku.....	3
2.1	Definice biomateriálu	3
2.2	Složení biologických materiálů	7
2.3	Funkce a využití biomateriálů v lidském těle.....	12
2.4	Realizace pomocí 3D tisku.....	18
3	Příčiny, důsledky a využití biodegradace biomateriálů ve tkáňovém inženýrství	24
3.1	Příčiny vzniku degradačních procesů.....	25
3.2	Důsledky biodegradace	26
3.3	Využití řízené biodegradace	28
3.4	Současné biodegradační metody	30
3.4.1	Akcelerovaná biodegradace <i>in vitro</i>	32
3.4.2	Přirozená biodegradace <i>in vitro</i>	33
3.4.3	Biodegradační média	34
4	Experimentální biodegradace zvoleného biomateriálu	36
4.1	Materiál a metodika.....	39
4.1.1	Charakteristika směsí PLA/PHB a příprava 3D scaffoldů	39
4.1.2	Akcelerovaná degradace	43
4.1.3	Přirozená degradace	46
4.1.4	Metody analýzy	47
4.2	Výsledky experimentu.....	49
4.2.1	Hodnocení hmotnostních změn.....	50
4.2.2	Analýza morfologických změn pomocí mikroskopických metod.....	57
4.3	Návrh zkušební metodiky pro biodegradaci scaffoldů ze směsí PLA/PHB.....	61
5	Diskuse	63
6	Závěr.....	67
7	Literatura a zdroje	68
8	Seznam použitých zkratk.....	83
9	Seznam obrázků	84
10	Seznam tabulek a grafů	86

1 ÚVOD A CÍL PRÁCE

V posledních letech narůstá počet pacientů čekajících na transplantaci, ale orgánů se jim mnohdy dostane pozdě, nebo vůbec. I v případě, že se dostanou na řadu včas, nemají zcela vyhráno, protože tělo nemusí nový implantát přijmout a jeho biologická odezva může být pro život pacienta fatální. Lidské tělo je v podstatě struktura, která je kompletně sestavená z biologicky rozložitelných materiálů, což umožňuje buňkám v organismu nahradit či odstranit poškozené nebo staré tkáně novým materiálem. V důsledku toho byly vyvinuty vstřebatelné biomateriály pro aplikaci ve tkáňovém inženýrství, kde také nastupuje možnost využití biologického 3D tisku, který byl mohl být východiskem pro nedostatečné množství implantátů. 3D biotisk je druhem 3D tisku s využitím různých biomateriálů a živých buněk. Vzhledem k tomu, že dnešní doba se vše snaží urychlit a automatizovat, dala tak vzniknout této technologii. Každou chvíli se vynořují stále nové informace a unikátní nápady, které dále rozšiřují možnosti této pozoruhodné technologie. V neposlední řadě se vědci a lékaři snaží zařadit 3D biotiskárny do světa medicíny a dosahují s touto technologií enormních úspěchů. Uplatnění 3D biotiskáren v medicíně v budoucnu je pro lidskou populaci cestou, jak vyrobit implantát rychle, levně, bez chyb a s minimálním odpadem.

Klíčem k této technologii je však kromě zařízení samotného také materiál, ze kterého je daný produkt vytvořen. Ačkoli se o biomateriálech a jejich využívání ví již dlouhou dobu, jejich rozvoj byl silně omezen dřívějším nedostatkem aseptických chirurgických postupů. Aby bylo možné vytisknout přesné tvary implantátu je třeba použít biodegradabilní porézní matrici, do které se buňky umístí – tzv. scaffold. Ten zároveň složí jako konstrukce i jako prostředí pro kultivaci buněk. Pro dosažení správného uchycení buněk a jejich dalšího růstu musí mít však tato konstrukce příznivé mechanické a chemické vlastnosti a dostatečnou pórovitost pro růst a proliferaci buněk. Fundamentálními složkami v procesu tohoto druhu tisku jsou biomateriály potřebné pro vytvoření matrice požadované tkáně či orgánu. Stavebním materiálem pro tvorbu nové tkáně jsou poté extrahované lidské buňky, které jsou umístěny do dané matrice. Odbouratelnost těchto biomateriálů závisí na vybraném druhu materiálu nebo jejich směsi, podmínkách, ve kterých dochází k degradaci (*in vitro* nebo *in vivo*) a přítomnosti externích aditiv. Následná biodegradace může být poté ovlivněna změnou hydrolytických či enzymatických složek nebo poměry jednotlivých látek v daném biomateriálu.

Všechna zmíněná témata jsou obsažena v této diplomové práci. Největší motivací pro vytvoření práce byla skutečnost, že počet pacientů, kteří nutně potřebují nahradit tkáň nebo orgán se neustále zvyšuje, kdežto počet zdravých dárců zůstává konstantní. Aby se zamezilo vniknutí cizorodých částic při další operaci do organismu, kdy už mají být podpůrné implantáty odstraněny, bylo by třeba, aby se materiál pozvolně rozkládal spolu s jeho postupným nahrazováním tkání. Další motivací je tedy rovněž možnost řešení otázky biodegradability 3D scaffoldů z těchto biomateriálů v simulovaných laboratorních podmínkách lidského organismu a návrh metody odstranění, jelikož je v současné době mizivé a nedostatečně popsané množství metodických přístupů k této problematice.

Cílem práce bylo vytvoření polymerních scaffoldů ze směsí kyseliny polyléčné a polyhydroxybutyrátu s využitím 3D tiskové techniky. V experimentální části byla použita zmíněná polymerní směs s přidavkem změkčovadla triacetin v poměrech 0 %, 5 % a 10 %. Směs byla zpracována pomocí 3D biotiskárny do formy cylindrických scaffoldů. V práci byly popsány dva různé způsoby *in vitro* biodegradace – akcelerovaná a přirozená. Akcelerovaná degradace byla testována v laboratoři Katedry environmentálního inženýrství Hornicko-geologické fakulty Vysoké školy Báňské – Technické univerzity Ostrava a přirozená degradace byla realizována v laboratorních prostorách Katedry biomedicínského inženýrství Strojní fakulty Technické univerzity v Košicích. Jelikož je v současné době malý počet publikací týkajících se degradace této směsi dalším cílem po testování byla sumarizace poznatků a vytvoření nové metodiky, která by v tomto směru umožnila posun.

Na základě výsledků této práce by v budoucnu tento materiál mohl být použit pro výrobu reálných medicínských implantátů močové trubice, pokud se prokáže jako dobře degradovatelný v podmínkách *in vitro*. Diplomová práce bude výchozí studií pro disertační práci, která by měla být zaměřena na testování *in vivo* a využití biomateriálu v reálné medicínské aplikaci. Biomateriály a implantáty z nich vytvořené se zasloužily o zlepšení kvality života milionů lidí téměř po celém světě. Samotný biomateriál musí být vybrán tak, aby korespondoval s podmínkami lidského těla a byl s ním biokompatibilní. Konečným triumfem vědy a technologie biomateriálů by bylo, aby se implantáty chovaly nebo fungovaly stejně jako orgány nebo tkáně, aniž by ovlivnily ostatní tkáně nebo orgány a měly jakýkoli negativní vliv na duševní stav pacienta. Pravá regenerace přirozeného orgánu by byla samozřejmě lepší než jakákoli umělá, ale to je zatím nad rámec biomateriálů.

2 BIOMATERIÁLY, JEJICH SLOŽENÍ A FUNKCE V LIDSKÉM TĚLE, MOŽNOSTI JEJICH REALIZACE POMOCÍ 3D TISKU

Využití materiálů za účelem opravy nebo nahrazení částí lidského těla se dle vědců datuje již do starověku, kdy se přírodní materiály jako např. dřevo či zvířecí kůže pokusně používaly při náhradě tkání ztracených traumaticky nebo po těžké nemoci (viz obr. 1). Historicky byl výběr materiálu založen na dostupnosti a lidské vynalézavosti v dané době (Huebsch a Mooney, 2009). Na počátku 20. století začaly být přírodní materiály nahrazovány novými syntetickými materiály, které měly lepší vlastnosti, funkčnost a vyšší reprodukovatelnost. Tyto výhody vedly k výraznému zvýšení rozsahu použití a účinnosti biomateriálů, díky čemuž byly zachráněny nebo výrazně zlepšeny miliony životů po celém světě (Hildebrand, 2013; Ratner a kol., 2004).



Obr. 1: Jedna z nejstarších dochovaných náhrad, tzv. Káhirský palec, cca z roku 1060 př. n. l. (Finch, 2012)

2.1 Definice biomateriálu

Biomateriál nemusí být nezbytně na bázi přírodního materiálu, jak může být usuzováno z tohoto názvu. Na Mezinárodním sympoziu Clemsonovy univerzity o biomateriálech, které se konalo roku 1976, byl biomateriál definován jako systémově a farmakologicky inertní substance určená k implantaci nebo začlenění do živého systému (Park, 1984). Tato definice odrážela tehdejší chápání funkce implantátů a ukládala požadavek inertnosti na materiál. V průběhu let, jak se věda rozvíjela a vedla k lepšímu pochopení interakce mezi biologií a materiály v těle, se také pozměnil pohled na biomateriály. V roce 1986 na konsensuální konferenci Evropské společnosti pro biomateriály byl biomateriál definován jako neživý materiál používaný ve zdravotnickém zařízení určený pro interakci s biologickými systémy (Williams, 1987).

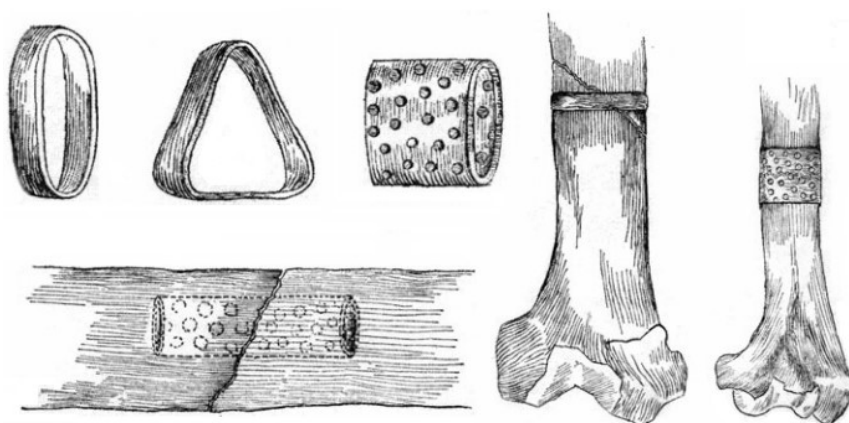
Možná ještě dokonalejší definice byla později poskytnuta přímo profesorem Davidem Franklinem Williamsem, který uvádí, že biomateriál je určený k propojení s biologickými systémy pro hodnocení, léčbu, augmentaci nebo nahrazení jakéhokoli tkáně, orgánu nebo funkce těla (Williams, 1999). Proto je třeba rozlišovat mezi biomateriálem, což je přírodní nebo synteticky vytvořený materiál používaný k nahrazení části živého systému nebo funkce v kontaktu s živou tkání, a biologickým materiálem, což je materiál jako např. kostní matrice či zubní glazura, produkovaný biologickým systémem (Koutský, 1997). Biomateriály tedy mohou být vytvořeny jak ze syntetických, tak i z přírodních materiálů. Materiály na bázi biologických materiálů jsou vytvářeny z přírodních zdrojů, jako jsou např. obiloviny, luštěniny, slaměná vlákna, bambus a mnohé další. Vyrábějí se prostřednictvím biosyntézy, biologického zpracování a biologické rafinace. Kromě již jmenovaných látek biomateriály rovněž zahrnují plasty a skleněná vlákna na bázi bioplynu a produkty z výroby cukru a kaučuku vyrobené termoplastickým zpracování biomasy, které jsou odbouratelné při vystavení účinkům mikroorganismů (Rivas a kol., 2016). Pod pojmem přírodní biomateriál si lze představit např. želatinový alginát, hedvábí, fibrin, celulózu, chitin nebo chitosan. Do syntetických materiálů řadíme kovy a slitiny, keramiku a sklo, kompozity a polymery (Stagner, 2016).

Od zavedení aseptických chirurgických postupů průkopníkem Josephem Listerem v šedesátých letech 20. století došlo k rychlému pokroku ve vývoji biomateriálů a implantátů pro různé aplikace v těle, viz tab. 1 (Agrawal a kol., 2014).

Tab. 1: Historicky významné objevy s využitím biomateriálů (upraveno podle Agrawal a kol., 2014)

rok	vědec	objev
1886	Carl Hansmann	destičky a šrouby pro fixaci zlomenin
1887	Adolf Fick	skleněné kontaktní čočky
1893	Nicholas Senn	biologicky rozložitelné kostní implantáty
1932	Albert Hyman a Mark Lidwill	přenosný kardiostimulátor
1938	Philip Wiles	celkové nahrazení kyčelního kloubu
1949	Harold Ridley	intraokulární čočka
1952	Arthur Bostwick Voorhees	osteointegrace kovových implantátů
1959	John Charnley	využití polymerů v kloubních spojih
1960	Albert Starr a Lowell Edwards	nahrazení mitrální chlopně
1981	Willem Johan Kolff	první umělé srdce, umělá ledvina

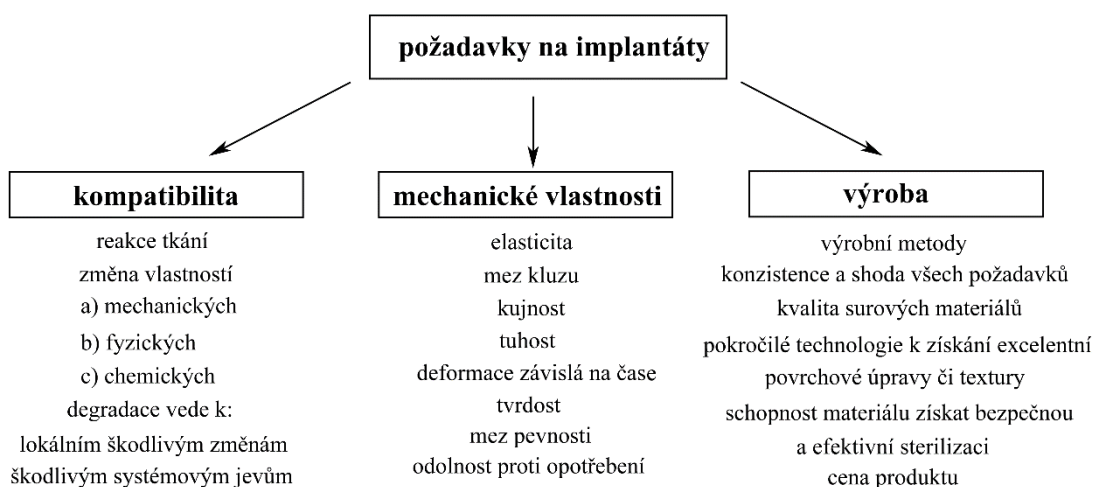
Americký chirurg Nicholas Senn se podrobně zabýval v roce 1893 tehdy známými metodami osteosyntézy. Studoval absorpci aseptické slonoviny a kosti v živých tkáních a vyvinul dutou perforovanou intra kostní dlahu, u které předpokládal absorpci v poměrně krátkém čase. Pro šikmé diafyzální zlomeniny navrhl extramedulární kostní kroužek, viz obr. 2. Úspěšně použil tento absorbovatelný kroužek, vyrobený z kravské kosti, u pacientů se zlomeninami femorálních, humerálních a tibiálních kostí. Profesor Senn může být tedy v jistém smyslu nazýván otcem biologicky rozložitelných implantátů (Bartoníček, 2010).



Obr. 2: Sennova dutá perforovaná intra-kostní dlahu (upraveno podle Senn, 1893)

Tkáňové inženýrství spojené s léčením nemocí je interdisciplinární a velmi atraktivní oblastí výzkumu jak v akademické sféře, tak v biotechnologickém průmyslu. Trojrozměrné 3D biomateriální scaffoldy mohou hrát kritickou úlohu ve vývoji nové tkáňové morfogeneze v interakci s lidskými buňkami. I když jednoduché polymerní biomateriály mohou poskytnout mechanické a fyzikální vlastnosti potřebné pro vývoj tkáně, nedostatečná biomimetická vlastnost a nedostatek interakcí s lidskými buňkami zůstávají problematické pro podporu tvorby funkčních tkání. Vývoj pokročilých funkčních biomateriálů, které reagují na stimul, by proto mohl být dalším krokem k tvorbě inteligentních 3D biomimetických matric, které interagují s lidskými kmenovými buňkami a vedou k vytvoření funkční tkáně v krátké době. K dnešnímu dni jsou inteligentní biomateriály navrženy tak, aby spolupracovaly s biologickými systémy v široké škále medicínských aplikací – od dodávání bioaktivních molekul a buněčných adhezních mediátorů, až ke konstrukci funkčních tkání, a tím k léčbě onemocnění (Khan a Tanaka, 2018).

Tkáňové inženýrství by mělo být chronologicky považováno za další vývojový krok ve vývoji biomateriálů. Bylo definováno Davidem Williamsem jako přesvědčení těla, aby se samo uzdravilo prostřednictvím dodávání molekulárních signálů, buněk a podpůrných struktur na příslušná místa (Williams, 1999). Pokud jde o protézy nebo zařízení, tkáňové inženýrství se zaměřuje na vývoj funkčních náhrad, které jsou schopné kompenzovat ztrátu tkáně nebo obnovit selhání orgánů. Toho se dá dosáhnout pomocí *ex vivo* manipulace s buňkami a tkáněmi a použitím růstových faktorů a jejich kombinacemi se scaffoldy biomateriálů. Není však jednoduché vytvořit správný materiál tak, aby vyhovoval veškerým požadavkům. Obr. 3 ilustruje všechny tři hlavní aspekty: kompatibilitu, mechanické vlastnosti i výrobní kritéria, která jsou nezbytná pro správné fungování samotného materiálu v implantátu. Pokud není materiál biologicky a mechanicky kompatibilní, nelze už tento problém vyřešit konstrukčními změnami.



Obr. 3: Požadavky na vlastnosti implantátu (upraveno podle Sridhar a Rajeswari, 2009)

Předpokládá se, že v budoucnu biomateriály převezmou ještě významnější úlohu v medicíně, než mají dosud (Huebsch a Mooney, 2009). V poslední době se například velmi často hovoří o tzv. „smart biomateriálech“, což jsou inteligentní biomateriály, které již mají schopnost reagovat na změny fyziologických podmínek a exogenních podnětů. Termín smart se vztahuje k povaze interakcí mezi daným biomateriálem a okolními buňkami a tkáněmi (Pérez a kol., 2013). Inteligentní materiály mohou podporovat slibné genové terapie a zlepšit tak léčbu onemocnění. Nedávný pokrok v nejmodernějším designu a použití inteligentních biomateriálů ve tkáňovém inženýrství je možné pozorovat v systémech transportu léčiv, zdravotnických prostředcích i imunologii (Kowalski a kol., 2018).

2.2 Složení biologických materiálů

Na biologické materiály jsou z lékařského hlediska kladeny vysoké nároky. Volba použitého materiálu pro výrobu implantátu závisí zejména na biologické snášenlivosti, tzv. biokompatibilitě. Biokompatibilita je schopnost materiálu, systému nebo zařízení plnit funkci bez klinicky významné odezvy hostitele ve specifické aplikaci (Ratner, 2004). Biomateriál musí však být především neškodný pro tkáň i celý organismus, tzn. nesmí způsobovat zánětlivé projevy, musí být netoxický, nealergenní, nekarcinogenní, a také neradioaktivní. Musí mít také mechanicky a fyzikálně vhodné vlastnosti jako je dostatečná pevnost a pružnost. Mezi další požadavky při aplikaci vhodného biomateriálu patří také rentgenový kontrast a finanční dostupnost (Koutský, 1997). Úspěšná využití biomateriálu či implantátu jsou závislá na 3 hlavních faktorech – vlastnostech a biokompatibilitě materiálu, zdravotním stavu recipienta a kompetencích lékaře, který implantuje a monitoruje proces (Park a Lakes, 2007). Základní požadavky na složení biomateriálů, které jsou umísťovány do lidského těla, jsou uvedeny v tab. 2.

Tab. 2: Požadavky na funkční vlastnosti implantátů (upraveno podle Park a Lakes, 2007)

požadavky	specifikace
fyzikální	dostatečné pevné, ale zároveň flexibilní
chemické	nesmí být toxické, ani jinak reagovat s ostatními tkáněmi lidského těla
biologické	biokompatibilita a funkčnost – efekt protetického materiálu na lidské tělo, vliv vnějšího prostředí na použitý materiál
jiné	designové – některý materiál musí splňovat svůj designový účel ekonomické – náklady a rychlost výroby

Vlastnosti materiálu jsou určeny jeho strukturou i chemickým složením. Vzhledem k tomu, že chemické chování závisí v podstatě na vnitřním strukturálním uspořádání atomů, všechny vlastnosti materiálu mohou být přičítány struktuře. Struktura se vyskytuje na mnoha úrovních rozsahu. Velikost strukturních částic může být molekulární (0,1–1 nm), nanometrická nebo ultrastrukturní (1 nm – 1 μm), mikrostrukturní (1 μm – 1 mm) a makrostrukturní (> 1 mm). V čistých prvcích, slitinách, keramice a polymerech jsou hlavní strukturní znaky na molekulární úrovni (Agrawal, 1998).

Implantace je definována jako zákrok, při kterém dochází k přenosu anorganického nebo organického materiálu, tkáně živé či neživé. U implantačních materiálů je kromě mechanicko-fyzikálních a chemických vlastností důležitý účinek biologický, tj. reakce organismu. V mnohém tento biologický účinek s mechanicko-fyzikálními a chemickými vlastnostmi materiálu souvisí, často je však specifický pro určitou tkáň a její funkční začlenění v organismu. Vzájemnou interakci mezi neautogenním materiálem a vitální biologickou tkání nazýváme biokompatibilita. Pojem definoval v roce 1987 David Franklin Williams jako schopnost materiálu vyvolat vhodnou biologickou odezvu na danou aplikaci v těle (Williams, 1986). Biokompatibilita je zásadní vlastností biomateriálu a má celou škálu projevů znamenajících pozitiva nebo negativa pro výsledek implantace. Negativní účinky mohou být toxické, mutagenní, karcinogenní, hemolytické, případně mohou vyvolávat senzibilitu a imunologické změny. Implantační materiál rozdělujeme z hlediska biokompatibility na biotolerantní, bioaktivní a bioinertní; viz tab. 3 (Šimůnek a kol., 2008).

Bioaktivita je schopnost scaffoldu napodobovat reakci v živém systému. Bioaktivní materiály by měly vyvolat biologickou reakci, aby se vytvořila silná vazba mezi materiálem a tkání. Proto je úloha bioaktivity scaffoldu klíčová pro biomedicínské aplikace. Bioaktivní materiály se projevují hlavně vzájemným přizpůsobením bioaktivních kompozitů a povrchových povlaků. V úvahu je třeba vzít i biotoxicitu materiálu, která zapříčiňuje jeho odmítnutí živou tkání (Balakrishnan a kol., 2018).

Tab. 3: Rozdělení biomateriálů dle interakce s živou tkání organismu (upraveno podle Šimůnek a kol., 2008)

vlastnosti materiálu	interakce s živou tkání	příklady složení
biotoxický	patogenické až atrofické změny, celkové odmítnutí živou tkání	slitiny kovů obsahující vanad a kadmium, uhlíkové oceli
biotolerantní	tkání tolerovány, vznik různě silné spojovací vazivové vrstvy	slitiny obecných kovů, drahokovové ušlechtilé slitiny
bioinertní	pro tkáň plně akceptovatelné, bez znatelných změn, bezproblémové hojení	tantal, titan a jeho slitiny, aluminiumoxidová keramika
bioaktivní	biointegrace, tvorba přímých biochemických vazeb, volný růst tkáně	hydroxyapatitová keramika, bioaktivní sklokeramika

Většina biomateriálů používaných ve tkáňovém inženýrství pro implantologické účely jsou zcela běžnými materiály, které lze obecně rozdělit do následujících kategorií: přírodní biomateriály, kovy a slitiny, keramika a sklo, kompozity a polymery.

Přírodní biomateriály

Skupina přírodních biomateriálů zahrnuje přirozeně se vyskytující materiály a jejich chemické modifikace. Mezi jejich výhody patří to, že jsou biomimetické – napodobují přírodní materiály a struktury, mají větší biokompatibilitu ve srovnání se syntetickými materiály, mohou fungovat na molekulární úrovni. Ačkoli syntetické biomateriály mohou být flexibilnější ve svém designu, vědci se domnívají, že přirozeně odvozené biomateriály mají větší potenciál k dosažení klinického úspěchu, zejména jako materiály k hojení ran (Khaing a Schmidt, 2012). Přírodní materiály obvykle nevykazují problémy s toxicitou, kterou se často projevují syntetické materiály. Mohou také nést specifická vazebná místa pro protein a jiné organické prvky, které mohou napomoci hojení nebo integraci tkání (Zhong a Bellamkonda, 2008). Nevýhody přírodních biomateriálů spočívají v imunogenicitě – schopnosti vyvolat imunitní odezvu, jejich strukturální složitosti a také jejich tendenci k denaturaci nebo rozkladu při teplotách pod jejich teplotami tání. Příkladem se slibnými výsledky je kolagen, který je studován pro výrobu scaffoldů umožňujících růst nové tkáně (Kim a kol., 2019). Mezi další přírodní biomateriály patří želatina, hedvábná vlákna, fibrin, elastin, chitosan, alginát, hyaluronan a dextran (Agrawal a kol., 2014).

Kovy a slitiny

Prvním kovovým implantátem moderní doby byla nepříliš úspěšná Shermanova vanadová ocel, která však podléhala rychlé korozi. Aby se minimalizovalo riziko vzniku koroze, je třeba používat vhodné kovy, zabránit implantaci různých typů kovu do stejné oblasti a při konstrukci minimalizovat dutiny a štěrbiny (Koutský, 1997). Kovy se nejčastěji používají jako typ nosných implantátů. Využívají se u ortopedických operací, v maxilofaciální chirurgii, kardiovaskulární chirurgii a jako zubní materiály (Ping, 2014). Nejčastěji se používají nerezové oceli, komerčně čisté titanové a kobaltové slitiny. V tradičním pojetí kovových biomateriálů jsou vyžadovány kovy se zvýšenou odolností proti korozi v těle. Jako nová a perspektivní alternativa biomedicínských implantátů se nedávno objevila skupina materiálů na bázi biologicky rozložitelných kovů (BM). BM jsou kovy, u kterých se očekává, že po splnění úkonu *in vivo* při hojení tkání se beze zbytku v organismu rozloží. Z hlediska materiálového složení obsahují BM čisté kovy, biologicky rozložitelné slitiny nebo kompozity s kovovou maticí (Zheng a kol., 2014).

Keramika a sklo

Keramické implantáty jsou žáruvzdorné, polykrystalické sloučeniny, obvykle anorganické, zahrnující silikáty, kovové oxidy, karbidy a různé žáruvzdorné hydridy, sulfidy a selenidy. Důležitými faktory ovlivňujícími vztah mezi strukturou a vlastnostmi biomateriálů je relativní elektronegativita mezi pozitivními a negativními ionty (Koutský, 1997). Tradiční použití keramiky jako zpevňovacích materiálů je nejvíce rozšířeno v zubním lékařství. Patří sem materiály pro korunky, cementy a protézy. Nicméně jejich použití v jiných oborech biomedicíny nebylo v porovnání s kovy a polymery tak rozsáhlé. Například špatná lomová houževnatost keramiky výrazně omezuje jejich použití pro nosné aplikace. Některé keramické materiály se používají pro náhradu kloubů a pro opravu a augmentaci kostí. Výhodou využití keramiky oproti kovovým implantátům je však především lepší biokompatibilita a vzhled (Balakrishnan, 2018; Davis, 2003). Dnes se pacienti stále více zajímají o implantáty bez obsahu kovů. Sklářské keramiky jsou zvláště vhodné pro výrobu vnitřních výplní zubu, korunek a můstků, z důvodu lepších estetických vlastností. Keramické materiály s vysokou pevností vyhovují v situacích, kdy je materiál vystaven vysokým tažným silám (Höland a kol., 2008).

Kompozity

Kompozitní materiál je definován jako heterogenní materiál složený ze dvou nebo více fází vzájemně odlišných svými fyzikálními, chemickými a mechanickými vlastnostmi. Obvykle jedna fáze v kompozitu je spojitá, taková fáze se nazývá matrice; fáze, která je nespojitá, se nazývá výztuž (Park a Lakes, 2007). Nejznámějším přírodním kompozitem je bezesporu dřevo složené z celulózových vláken uložených v ligninu. Pro umělé kompozitní materiály je charakteristické, že se vyrábějí postupy mechanického mísení nebo spojování jednotlivých složek. Pro kompozitní materiály je charakteristický tzv. synergismus, tedy, že celkové vlastnosti kompozitu jsou lepší než vlastnosti jeho jednotlivých složek. Existence synergismu je velmi významná, neboť vede k získávání materiálů zcela nových vlastností. Nejúspěšnější kompozitní biomateriály se používají v oblasti zubního lékařství jako náhrady nebo zubní cementy. Kompozitní materiály se také hojně používají pro protetické končetiny, kde z nich jejich kombinace nízké hustoty, hmotnosti a vysoké pevnosti tvoří ideální prostředky pro uvedené aplikace (Davis, 2003; Kratochvíl a kol., 2005).

Polymery

Polymerní materiály mají nezastupitelnou roli v každodenním životě člověka. Nicméně s výjimkou přírodního kaučuku a několika dalších materiálů je výroba většiny polymerních materiálů stále vysoce závislá na zdrojích fosilních paliv, zejména na ropě a uhlí, což vede k řadě problémů týkajících se znečištění životního prostředí a lidského zdraví (Sheldon, 2014; Sun a kol., 2018). Polymery se tvoří spojením malých molekul prostřednictvím primárních kovalentních vazeb v hlavní řetězec skládající se z C, N, O, Si. Jsou to gigantické molekuly, které se při nízké molekulární hmotnosti chovají jako vosk, při vysoké molekulární hmotnosti jako olej a plyn. Dlouhé řetězce jsou velmi ohebné a mohou být snadno spleteny (Koutský, 1997).

V medicíně se používá v biomateriálech široká škála polymerů, a to od obličejových protéz, přes tracheální trubice, části srdce, ledvin a jater, zubních protéz až po klouby. Polymerní materiály se také používají pro lékařská lepidla a těsnicí materiály (Davis, 2003). Biologicky rozložitelné polymery obsahují polymerní řetězce, které jsou hydrolyticky nebo enzymaticky štěpeny, což vede k rozpustným degradačním produktům. Biologicky rozložitelné polymery mají také aplikace v přístupech s řízeným nebo dlouhodobým uvolňováním léčiv, dále jako tkáňové scaffoldy nebo dočasné protetické implantáty (Nair a Laurencin, 2007).

Příklad použití polymerického implantátu v očním lékařství (obr. 4) uvádějí ve své práci Karamichos a Hjortdal (Karamichos a Hjortdal, 2014), kteří popisují využití ke keratoplastice při léčbě keratokonu (keratokonus je onemocnění rohovky, při kterém se mění její obvyklý tvar, což poškodí vidění).



Obr. 4: Použití korneálního implantátu při keratoplastice (Karamichos a Hjortdal, 2014)

2.3 Funkce a využití biomateriálů v lidském těle

V medicíně je pojmem biomateriál označována látka, která byla navržena tak, aby interagovala s biologickými systémy pro léčebné účely – augmentace, oprava nebo náhrada tkáňové funkce těla nebo účely diagnostické (Davis, 2003). Biomateriály hrají klíčovou roli v úspěchu tkáňového inženýrství. Aby se nicméně vytvořily živé nové tkáně *in vitro*, které by byly identické s jejich přirozenými tělními protějšky a usnadňovaly regeneraci *in situ* tkání řízeným uvolňováním specifických chemokinů v místech úrazu, jsou nutné dočasné biologicky odbouratelné nosné matrice s přírodními, strukturálními a funkčními atributy připomínajícími tkáň (Williams, 2014). Podobně jako krevní sraženina, která slouží jako přírodní polymerní lešení při hojení ran, i matrice by měly mít žádoucí tvar, který by zajišťoval funkčnost a podporoval obnovu tkáně, dokud se nevytvoří dostatečná nová tkáň (Fonseca a kol., 2014).

Klíčovým cílem návrhu biomateriálu v tkáňovém inženýrství je tedy identifikovat nebo vyrobit látku, která je schopná převzít žádoucí formu a může být použita pro syntézu buněčného prostředí (Kim a kol., 2011). Materiál by měl být schopen udržovat svou strukturu a integritu v daných časových obdobích, aby se zajistilo formování nové tkáně dokonce i za extrémních podmínek. V posledních letech se vývoj regenerativních biomateriálů značně rozvinul tak, aby umožňoval sekvestraci (odloučení odumřelé tkáně od živé tkáně) a řízené uvolňování růstových faktorů, které pracují v souladu s materiály, aby dosáhly biologických vlastností na míru a zlepšily funkce, které mohou přesným mimickým způsobem kontrolovat cyklus kmenových buněk v podmínkách *in vitro* i *in vivo* (Laurencin a kol., 2014). Lékaři, výzkumní pracovníci a bioinženýři používají biomateriály pro následující širokou škálu aplikací jako jsou:

- medicínské implantáty – srdeční chlopně, stenty a štěpy; umělé klouby, vazy a šlachy, zubní implantáty a další;
- metody podporující hojení lidských tkání, včetně stehů a spon pro uzavírání ran a rozpustných obvazů;
- molekulární sondy a nanočástice, které pomáhají při zobrazování a léčbě nádorových onemocnění na molekulární úrovni;
- biosenzory pro detekci přítomnosti a množství specifických látek;
- systémy transportu léčiv, které nesou nebo cíleně aplikují látky.

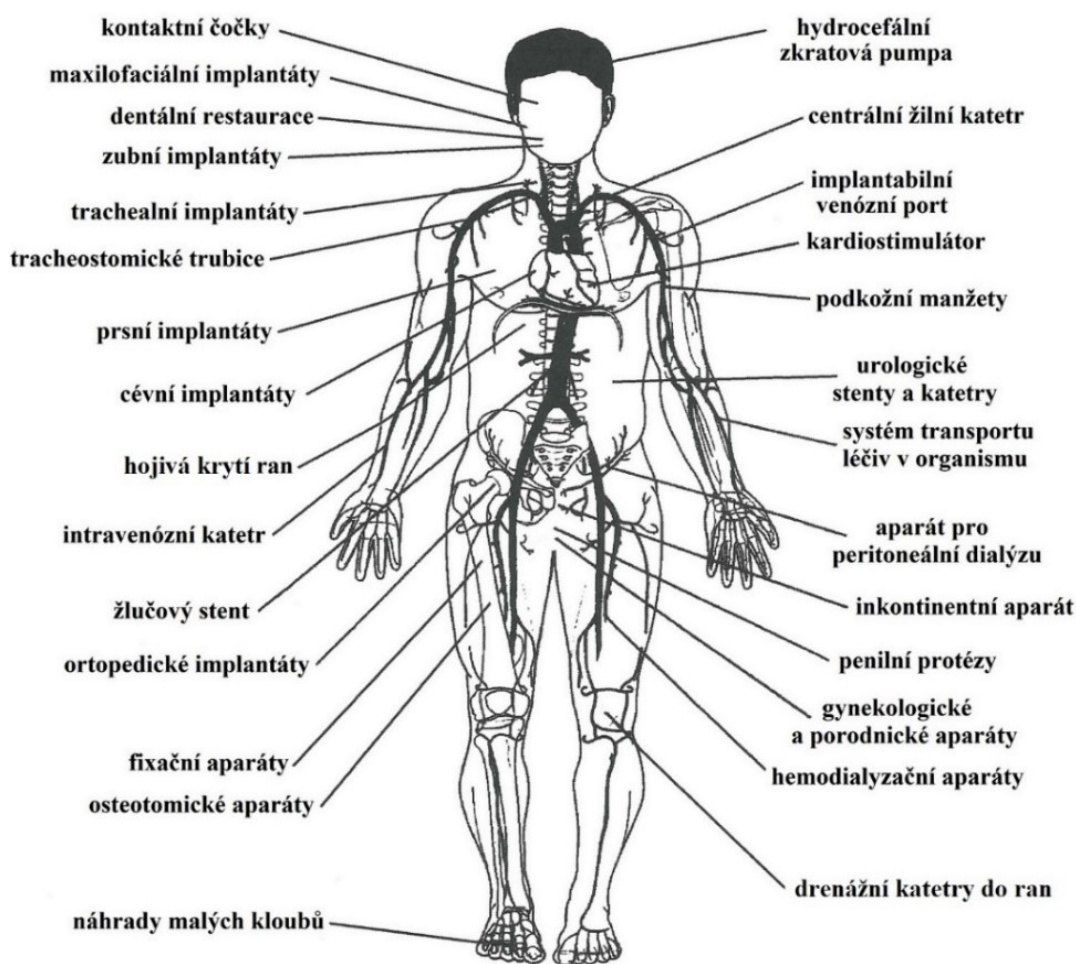
Klíčovou koncepcí těchto návrhů je znovuvytvoření nesčetných buněčných a molekulárních procesů, které se podílejí na regeneraci nové tkáně či orgánu (Martino a kol., 2012). Proto jsou konstrukce materiálových zařízení, které mohou nabývat mnoha podstatných vlastností buněčných matric, v popředí biomedicínské vědy a tkáňového inženýrství (Chen a Liu, 2016). Jak již bylo zmíněno, existuje několik kategorií biomateriálů, ale každá je vhodná pro jinou medicínskou aplikaci; viz tab. 4.

Tab. 4: Kategorie materiálů využívaných v lidském těle (upraveno podle Park a Lakes, 2007)

materiály		výhody	nevýhody	příklady využití
přírodní materiály	kolagen, želatina, chitosan, alginát	biomimetika, specifická vazebná místa	méně flexibilní, imunogenicita, tendence k denaturaci	scaffoldy pro podporu růstu nové tkáně, rohový implantát
kovy a slitiny	titan, Co-Cr slitiny, zlato, stříbro, nerezová ocel	pevné, těžko tvárné	mohou korodovat, o vysoké hustotě, obtížně vyrobitelné	náhražky kloubů, dentální kořenové implantáty, kostní destičky a šrouby
keramika	hliníková, zirkonová, kalciumfosfáty, uhlíková	velmi biokompatibilní	křehké, nejsou pružné, slabé v tahu	dentální a ortopedické implantáty
kompozity	uhlíkové, vyztužený kostní cement	pevné, vyráběné na míru	obtížně vyrobitelné	kostní cement, dentální kompozity
polymery	nylon, silikon, pryž, polyester	flexibilní, snadno vyrobitelné	nedostatečné silné, časem se deformují, mohou degradovat	stehy, krevní cévy, měkké tkáně, kyčelní labrum, ucho, nos

Nemoci, poranění a trauma mohou vést k poškození a degeneraci tkání v lidském těle, což vyžaduje léčbu, která by usnadnila, ale i urychlila jejich opravu, náhradu nebo regeneraci. Léčba se typicky zaměřuje na transplantaci tkáně z jednoho místa do druhého u jednoho pacienta (autograft), nebo od jednoho jednotlivce k druhému (transplantát nebo aloimplantát). I když jsou oba typy revoluční a zachraňují životy, je s nimi spojeno příliš mnoho problémů. Sběr autograftů je drahý, bolestivý, omezený anatomickými limity a mnohdy spojený dokonce s úmrtností dárce způsobenou infekcí či hematodem. Podobně alotransplantáty a transplantace také mají vážná omezení kvůli problémům s přístupem k dostatečnému množství tkání pro všechny pacienty, kteří je potřebují, a skutečnosti, že

existuje riziko odmítnutí alotransplantátu imunitním systémem pacienta a možnost zavést infekci nebo chorobu od dárce. Alternativně může být oblast tkáňového inženýrství zaměřena na regeneraci poškozených tkání namísto jejich nahrazení, a to vývojem biologických náhrad, které obnovují, udržují nebo zlepšují funkci tkáně (O'Brien, 2011). Biomateriály jsou v medicíně využívány především jako součásti medicínských zařízení, biosenzorů, implantátů, nosičů léčiv či buněk. Schéma jejich využití pro účely implantologie je znázorněno na obr. 5.



Obr. 5: Schéma využití implantátů v medicíně (upraveno podle Park a Lakes, 2007)

Jedním z hlavních důvodů, proč jsou biomateriály používány, je fyzická náhrada tvrdých nebo měkkých tkání, které se poškodily nebo zničily některým patologickým procesem, jako jsou např. zlomeniny, infekce a rakovinná bujení způsobující bolest, znetvoření nebo úplnou ztrátu funkce. Za těchto okolností je možné odstranit nemocnou tkáň a nahradit ji vhodným syntetickým materiálem (Davis, 2003).

Kardiovaskulární aplikace

Onemocnění srdce je hlavní příčinou úmrtí a zdravotního postižení na celém světě, což představuje přibližně 40 % veškeré mortality (údaj z r. 2007). Srdeční selhání je stav, který odráží zhoršení účinnosti čerpací funkce srdce, a je způsobeno celou řadou onemocnění, jako je např. ischemická choroba srdeční – s akutním infarktem myokardu, nebo bez něj –, hypertenzní srdeční onemocnění nebo chlopňové onemocnění srdce. V kardiovaskulárním systému mohou vzniknout problémy se srdečními chlopněmi a tepnami, jež lze úspěšně léčit implantáty (Chen a kol., 2013). Srdeční chlopně trpí strukturálními změnami, které zabraňují úplnému otevření nebo uzavření. Nemocná chlopeň může být nahrazena řadou náhrad. Myokardiální tkáňové inženýrství se setkává s řadou výzev, které jsou seskupeny do tří kategorií, spojených s buňkami, materiály a vaskularizací. Kombinované paradigma, které ke zvýšení buněčného růstu a proliferace – pro podporu vaskularizace a poškozeného srdce – využívá kmenové buňky, signalizační molekuly (geny) a nové biomateriály, bude zapotřebí k učinění pokroku ve tkáňovém inženýrství (Chen a kol., 2008). Stejně jako v případě ortopedických implantátů se jako stavební materiál používají keramické materiály, kovy a polymery. Zejména koronární arterie a cévy dolních končetin jsou blokovány tukovými ložisky a v některých případech je možné nahradit segmenty umělými tepnami.

Ortopedie

Jednou z nejvýznamnějších oblastí použití biomateriálů jsou ortopedické implantáty. Jak osteoartróza, tak revmatoidní artritida ovlivňují strukturu volně pohyblivých (synoviálních) kloubů, jako je kyčelní kloub, koleno, rameno, kotník a loket. Bolest ve více zatěžovaných kloubech, zejména v kyčelním a kolenním, může být značná a účinky na ambulantní funkci jsou mnohdy zničující. Od příchodu anestezie a antibiotik bylo možné tyto klouby nahradit protézami, které přinášely úlevu od bolesti a obnovení pohyblivosti. Ortopedický chirurg používá materiály k různým účelům při léčbě postižení muskuloskeletálního systému. Existuje mnoho požadavků, které tyto materiály musí splňovat, jestliže mají vytvořit dočasné nebo trvalé spojení s částí ošetřovaného těla a každý materiál je často jedinečný a přizpůsobený konkrétnímu použití. Úvahy o ideálním materiálu pro ortopedické aplikace zahrnují jeho materiálovou pevnost a tuhost, biologickou odezvu, toxicitu a vodivost (Davis, 2003; Ong a kol., 2014).

Uzavírání ran

Jedno z nejstarších použití implantabilních biomateriálů lze vysledovat zpět do zavádění stehů pro uzavěr ran. Byly nalezeny důkazy, že již ve starověkém Egyptě, okolo roku 4000 př. n. l., bylo hojně používáno lněné vlákno pro uzavírání lidských ran. (Davis, 2003). Od té doby bylo na stehy použito mnoho různých materiálů, jako např. železné, zlaté nebo stříbrné dráty, vysušená střeva, koňské žíně, hedvábí, plátna a šlachy. V dnešní době již už téměř každá operace vyžaduje použití biomateriálů k uzavření rány pro následné úspěšné vyléčení, přičemž správné uzavření rány může ovlivnit úspěšnost operace. Potřebné biomateriály pro uzavření rány závisí do určité míry na typu rány, který má být uzavřen; nicméně všechny biomateriály pro uzavření rány musí během kritického období hojení udržet dostatečnou pevnost v tahu. Měly by rovněž vyvolat minimální reakci tkáně, která by mohla narušit proces hojení. Materiály pro šití jsou nejčasnější a nejčastější aplikací textilních materiálů pro chirurgické uzavření rány. Syntetické látky pro šicí materiály zahrnují jak polymery, tak i některé kovy (Chu a kol., 2018).

Oftalmologie

Přestože je oko velmi složitý orgán, je přístupnější k lékařskému pozorování a chirurgické manipulaci než většina jiných. To pravděpodobně vysvětluje, proč bylo oko orgánem, ve kterém byla úspěšně provedena první transplantace dárcovské tkáně u lidí už v roce 1906 (Zimr, 1906). Oftalmologie se zaměřuje na onemocnění oka, což je složitý a životně důležitý orgán pro každodenní život. Tkáně oka mohou trpět několika nemocemi, což vede ke snížení vidění, a nakonec k oslepnutí. Katarakty například způsobují zakalení čočky. Ta může být nahrazena syntetickou (polymerní) čočkou. Materiály pro kontaktní čočky jsou také považovány za biomateriály, protože jsou v těsném kontaktu s tkáněmi oka (Chirila a Damien, 2016). Aplikace biomateriálů v oftalmologii může být datována až do poloviny 19. století, kdy Adolf Fick úspěšně vynalezl skleněnou kontaktní čočku. Od té doby se vyvinula široká paleta oftalmologických biomateriálů a některé našly ohromný úspěch v klinických aplikacích. Aplikace biomateriálů v oftalmologii zahrnují kontaktní čočky, nitrooční čočky, umělé orbitální stěny, umělé rohovky, umělé slzné kanálky, glaukomové filtrační implantáty a sítnice. Přestože keramika a kovy byly také používány v oftalmologii, moderní oční implantáty jsou vyrobeny převážně z polymerů (He a Benson, 2017).

Dentální aplikace

Nejstarší vědecká práce týkající se dentálních materiálů začala v laboratoři G. V. Blacka na Northwestern University v roce 1900 s prvními kontrolovanými pokusy se zubním amalgámem. Potřeba biokompatibilních materiálů pro použití v restaurační stomatologii a endodoncii vyvolala požadavek na testy cytotoxicity (Murray a kol., 2007). V ústech mohou být zuby i podpůrné tkáně dásní snadno ničeny bakteriálně kontrolovanými onemocněními. Zubní kazy (dutiny), demineralizace a rozpouštění zubů spojených s metabolickou aktivitou v plaku mohou způsobit rozsáhlou ztrátu zubů. Zuby v celku a segmenty zubů mohou být nahrazeny nebo obnoveny různými materiály, viz obr. 6. Mnoho různých syntetických biomateriálů, které by mohly být vybrány pro konstrukci běžně dostupných a užívaných endosteálních zubních implantátů, byly vyvinuty z titanu a jeho slitin a keramické nebo fosfátovo-keramické sloučeniny vápníku jako jejich biofilmy; viz obr. 7, který ilustruje využití kovových materiálů k rekonstrukci mandibuly. Materiál se obvykle vybírá na základě fyzikálních a mechanických kritérií – pevnost v tahu, lámavost, kujnost a modul pružnosti (Lemons, 2004). Slinutá keramika a sklokeramika jsou široce používány jako biomateriály pro zubní restaurování. Biomateriály byly vyvinuty buď pro rámování kovových dých, nebo pro výrobu zubních výplní bez kovů. Různé typy sklářské keramiky jsou dnes nezbytné k uspokojení různých potřeb pacientů (Höland a kol., 2014).



Obr. 6: Keramické dentální implantáty (upraveno podle CeraRoot, 2018)



Obr. 7: Využití kovových implantátů k rekonstrukci mandibuly (upraveno podle Kanno a kol., 2014)

2.4 Realizace pomocí 3D tisku

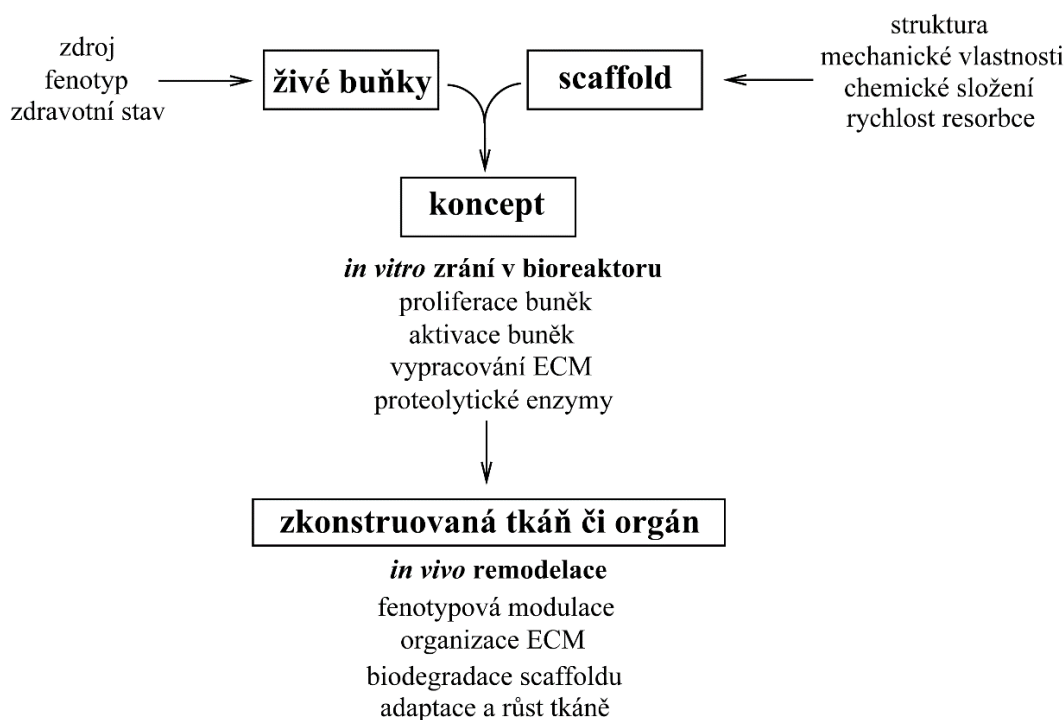
V uplynulém desetiletí došlo k velkému pokroku v oboru rychlé prototypové technologie výroby, tzv. rapid prototyping technology – od plastů a keramických materiálů přes kovy až po technologii biotiskáren (bioprinterů), kde se materiál, který se používá pro tisk, sestává přímo z reprodukováných lidských tkání. Díky této technologii lze vytvářet reálné 3D modely orgánů a tkání, které by měly pomoci chirurgům v předoperačním plánování a mohly být použity jako náhradní části pro transplantace, viz obr. 8. Hlavní důraz je kladen na technologii tkáňového inženýrství, která má nejlepší předpoklady k řešení problémů s transplantací (Hudák a kol., 2013; Wallach-Kloski a Kloski, 2017). Díky pokroku v technologii zpracování a výzkumu materiálů má 3D tisk mnoho revolučních aplikací, včetně tisku biokompatibilních buněk a nosičů pro konstrukci živých tkání.



Obr. 8: Kraniální implantát pro pacienta po mozkové mrtvici (TCT Magazine, 2015)

3D tisk je proces, který mění digitální modely na trojrozměrné objekty vytvořením po sobě jdoucích vrstev tiskových materiálů, tedy proces vytváření fyzického objektu z dat pomocí speciální tiskárny. Data pro tisk mohou být vytvořena pomocí konstrukčního počítačového programu – dnes se pro ně využívá souhrnný název CAD (z ang. *Computer-Aided Design*) –, nebo mohou pocházet ze skenovacího zařízení, jako je například 3D optické skenovací zařízení, CT skenování (počítačová tomografie – *Computed Tomography*) nebo MRI (magnetická rezonance – *Magnetic Resonance Imaging*). Na základě vymodelované konstrukce je vytvořen 3D model, který vyplňuje rovinu pomocí jednoho nebo více geometrických útvarů. Pro 3D tisk mohou být využívány různé materiály, jako je např. termoplastický polymer, kov, UV vytvrditelná pryskyřice a další (Jo a kol., 2016).

Princip biotisku lze definovat jako umístování buněk v biomateriálech do prostorově definovaných struktur pomocí automatizovaných 3D biotiskových technologií. Celý proces vyžaduje dodání média pro buňky, které mohou být uloženy do navržených tvarů získaných z CAD modelů. Tento proces, dříve nazvaný cytoscribing, byl inspirován klasickými dvourozměrnými papírovými tiskárnami (Klebe, 1988). Měkké biomateriály obsahující živé buňky se nazývají bioink a jsou surovinou biotiskových procesů (Barnatt, 2016). V posledních dvou desetiletích se objevily různé procesy biotisku, spolu s různými bioinkovými materiály (Lee a kol., 2014, Kucukgul a kol, 2015). Jak je již výše zmíněno, proces biotisku má za úkol vytvoření buněčné matrice obsahující buňky, kterou je možné po vytištění implantovat pacientovi. Proces tvorby implantátu je ilustrován na obr. 9.



Obr. 9: Proces tvorby implantátu (upraveno podle Rabkin a Schoen, 2002)

V prvním kroku se diferencované nebo nediferencované buňky naočkují na biologicky resorbovatelné skelety a pak konstrukt zraje *in vitro* v bioreaktoru. Během dozrávání buňky proliferují a zpracovávají extracelulární matici za vzniku nové tkáně. Ve druhém kroku je konstrukt implantován ve vhodné anatomické poloze, kde má remodeling *in vivo* za cíl vytvořit a napodobit normální struktury a funkce tkání nebo orgánů (Rabkin a Schoen, 2002).

Vzhledem k tomu, že se v oblasti zdravotní péče stále zvyšuje kvalita, tak se všichni odborníci snaží o efektivnější využití a implementace nových technologií. Lékařské využití 3D tisku zahrnuje vzdělávání, chirurgické plánování, vlastní léčbu v praxi, komunikaci s pacientem, až po vlastní testování náhrady.



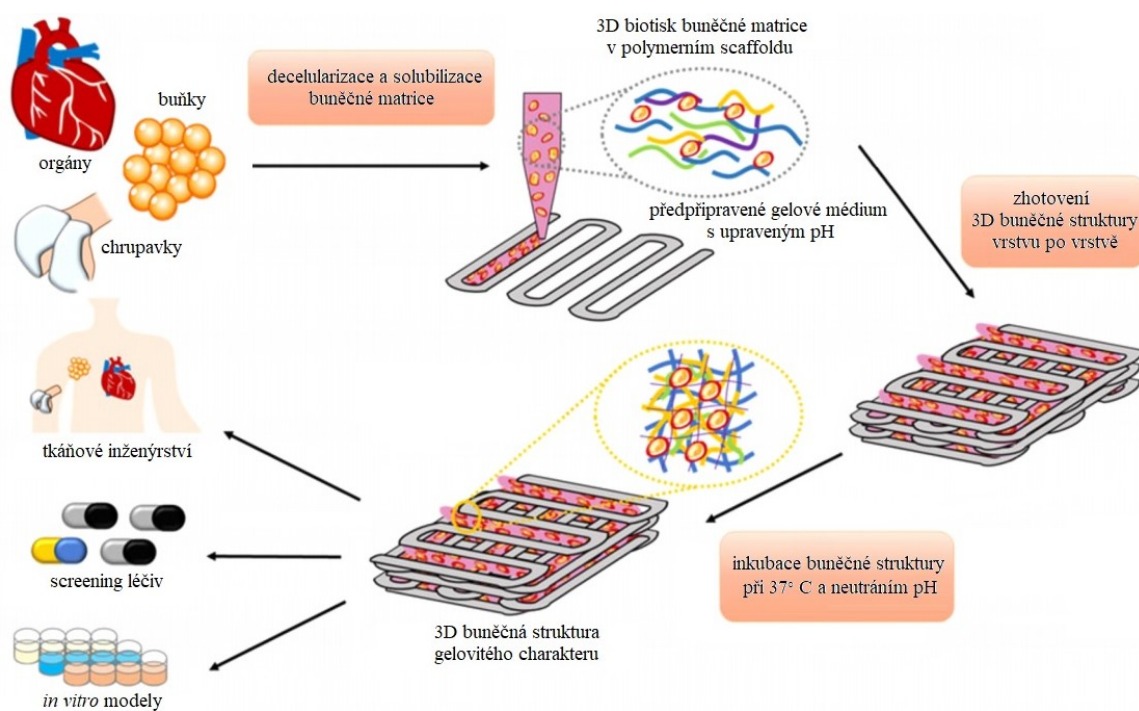
Obr. 10: 3D model mozkového (vlevo) a maxilárního (vpravo) nádoru (TeraRecon, 2017)

Obr. 10 ilustruje modely nádorů vytištěných s pomocí 3D tiskárny – vlevo je mozkový nádor umístěný v obou hemisférách, vpravo lze vidět model vysoce složitěho typu čelistního nádoru včetně invaze do kostí. Kloubový a plátkový design umožňuje rozřezat model v libovolné rovině, aby bylo možné lépe diagnostikovat případ. Tvary nádoru mohou být dokonale reprodukovány pomocí různých 3D tiskových platforem, které mohou pomoci chirurgovi dokonale naplánovat operaci. Bez ohledu na typ tkáně je při navrhování scaffoldů pro použití ve tkáňovém inženýrství důležitá řada vlastností. Prvním kritériem pro tkáňové inženýrství je to, že musí být biokompatibilní; buňky musí adherovat, fungovat normálně a migrovat na povrch – a nakonec skrze scaffold začít proliferovat. Po implantaci musí konstrukce vyvolat minimální imunitní reakci, aby se zabránilo vzniku komplikací, které by mohly zhoršit hojení nebo způsobit odmítnutí náhrady. Jako další kritérium musí být brána v potaz biologická rozložitelnost. Cílem tkáňového inženýrství je umožnit vlastním buňkám v průběhu času eventuálně nahradit konstrukci implantovaného scaffoldu. Vzhledem k tomu, že nejsou určeny jako trvalé implantáty, musí být biologicky odbouratelné (Babensee a kol., 1998; Lam a kol., 2002).

Také musí být z vhodných materiálů, jejichž degradací musí vznikat v těle netoxické vedlejší produkty, které jsou schopné opustit tělo bez zásahu do jiných orgánů. Za účelem umožnění degradace v kombinaci s tvorbou tkáně je zapotřebí imunitní odpověď kombinovaná s řízenou infuzí buněk, především s makrofágy (Brown a kol., 2009; Lyons a kol., 2010). V ideálním případě by scaffold, tedy buněčné lešení či matrice, měl mít mechanické vlastnosti anatomicky odpovídající místu, do něhož má být implantován, a z praktického hlediska musí být dostatečně silný, aby umožňoval chirurgovi dobrou manipulaci během implantačního zákroku. Výroba bioimplantátů s odpovídajícími mechanickými vlastnostmi je jednou z velkých výzev při pokusech o konstrukci kosti nebo chrupavky. Pro tyto tkáně musí mít implantované materiály dostatečnou mechanickou integritu, aby fungovaly od doby implantace až po dokončení procesu remodelování (Hutmacher, 2000). Mnoho materiálů bylo vyrobeno s dobrými mechanickými vlastnostmi, ale na úkor udržení vysoké poréznosti; a mnoho materiálů, které prokázaly potenciál *in vitro*, selhaly při implantování *in vivo* z důvodu nedostatečné kapacity pro vaskularizaci. Je zřejmé, že je nutné zachování rovnováhy mezi mechanickými vlastnostmi a porézní architekturou k tomu, aby byla umožněna úspěšná infiltrace buněk a vaskularizace (O'Brien, 2011).

Konstrukce buněčných matric používaných pro tkáňové inženýrství má zásadní význam. Měly by mít vzájemně propojenou strukturu a vysokou pórovitost, aby se zajistila buněčná penetrace a dostatečná difuze živin do buněk v konstrukci a do extracelulární matrice tvořené těmito buňkami. Kromě toho je potřeba vytvořit porézní propojenou strukturu, která by umožnila difuzi odpadních produktů ze scaffoldů (Ko a kol., 2007; Phelps a kol., 2009). Dalším klíčovým prvkem je průměrná velikost pórů. Buňky primárně interagují s matricí přes chemické skupiny (ligandy) na povrchu materiálu. Póry tak musí být dostatečně velké, aby umožnily buňkám migrovat dovnitř struktury, kde se eventuálně na ligandy navážou (Murphy a O'Brien, 2014; O'Brien a kol., 2005). K posledním, ale nejdůležitějším faktorům patří výrobní technologie. K tomu, aby se konstrukce konkrétního scaffoldu stala klinicky a komerčně životaschopnou, měla by být nákladově efektivní. Rozvoj výrobních postupů podle standardů správné výrobní praxe (*Good Manufacturing Practice*) je rozhodující pro úspěch strategií tkáňového inženýrství v klinické praxi (Hollister, 2009; Lee a Niederer, 2010).

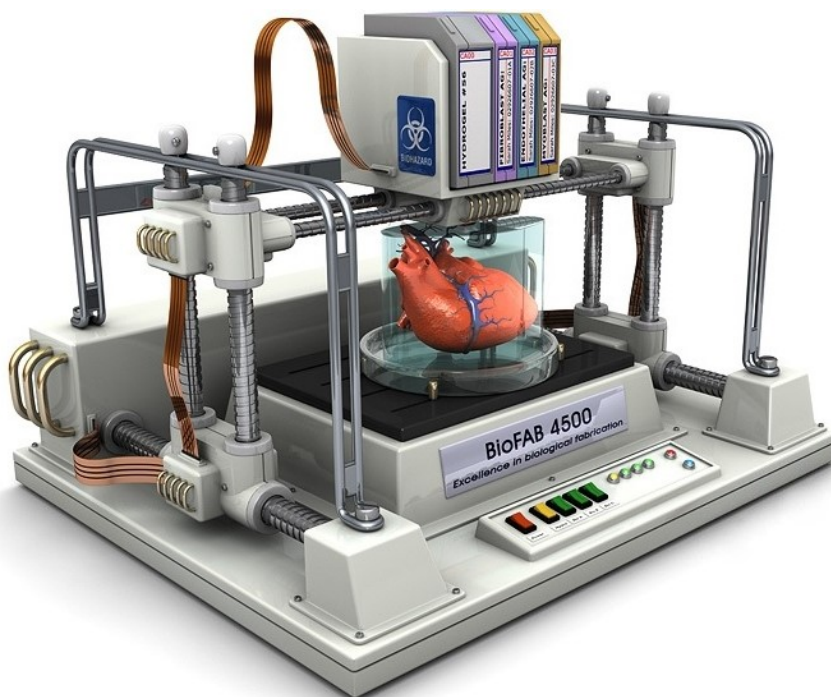
Schopnost tisknout všechny složky, které tvoří tkáň, tedy buňky a matricové materiály ve třech rozměrech, aby se vytvořily struktury podobné tkáni, je hlavním smyslem biotisku. Většina dosud používaných matricových materiálů pro biotisk však nemůže dosáhnout složitosti přirozené extracelulární matrice (ECM), a není tedy schopna rekonstruovat vnitřní buněčnou morfologii a funkce tkáně (Pati a kol., 2014). Proces biotisku s využitím buněk je zobrazen na obr. 11. Příslušné tkáně jsou po odběru z pacienta decelularizovány kombinací fyzikálních, chemických a enzymatických procesů a poté solubilizovány v kyselých podmínkách. Následně je pH upraveno na fyziologické hodnoty. Tkáňový tisk je prováděn s živými kmenovými buňkami, které se vkládají do bioinkoustu a kultivují při 37 °C.



Obr. 11: Výroba buněčných 3D matic z bioinkoustů (upraveno podle Pati a kol., 2014)

Trojrozměrný tisk se stává stále běžnější technikou pro výrobu scaffoldů a zařízení pro aplikace tkáňového inženýrství. To je dáno potenciálem 3D tisku poskytovat pacientům specifické návrhy, vysokou konstrukční složitost, rychlou výrobu na vyžádání a za nízkou cenu. Jednou z hlavních překážek, které omezují rozvoj 3D tisku v bioprodukcí, je nedostatek rozmanitosti tiskových bioinkoustů. Přestože byla vyvinuta široká škála bioinkoustů, včetně polymerů, keramiky, hydrogelů a kompozitů, stále vznikají problémy se zpracováním těchto materiálů pro 3D biotisk, biodegradaci a biologickou aktivitou a jejich následně pozměněnými mechanickými vlastnostmi (Guvendiren a kol., 2016).

V poslední době rychlý pokrok v oblasti tiskových procesů a vývoje materiálů pro 3D tisk umožnil tisk pokročilejších (inteligentních) materiálů, tzv. multimateriálů, určených také ke změně funkce nebo tvaru. V této souvislosti byl nedávno učiněn významný pokrok v technologii 3D tisku s ohledem na materiály, tiskárny a procesy. Trojrozměrná technologie 3D tisku je vysoce univerzální a efektivní z hlediska konstrukce, výroby a aplikací, nicméně nedávno představený typ 4D tisku se jeví do budoucna ještě slibněji. Výzkum tisku 4D vzbudil nebývalý zájem od roku 2013, kdy byla tato myšlenka poprvé představena. Je založen na technologii 3D tisku, ale vyžaduje další podněty z prostředí, na které jsou schopny materiály reagovat. I když je tedy technologie 4D podobná technologii 3D tisku, tisková technologie 4D přidává čtvrtou dimenzi, a to času. 4D tisk umožňuje tištěné struktury měnit svou formu nebo funkci s časem v reakci na podněty, jako je tlak, teplota, vítr, voda, vlhkost, pH, světlo a další (Choi a kol., 2015). Na základě určitých interakčních mechanismů mezi podnětem a inteligentními materiály, jakož i vhodným návrhem multimateriálních struktur z matematického modelování, se 4D tištěné struktury vyvíjejí a vykazují inteligentní chování, viz obr. 12. To umožňuje samočinnou montáž, multifunkčnost, ale také samočinnou opravu (Momeni a kol., 2017). S ohledem na budoucí vývoj v této oblasti, výzkum a investice do 3D a inteligentní 4D tiskové technologie jsou nezbytným předpokladem pro zlepšení funkce biomateriálů nové generace (Jo a kol., 2016).

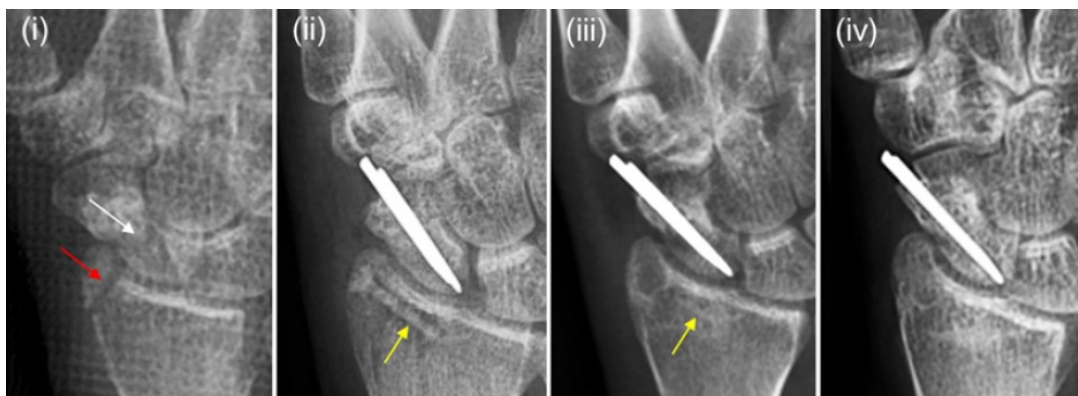


Obr. 12: Bioprinting budoucnosti – 4D tisk funkčního srdce z lidských buněk (Barnatt, 2016)

3 PŘÍČINY, DŮSLEDKY A VYUŽITÍ BIODEGRADACE BIOMATERIÁLŮ VE TKÁŇOVÉM INŽENÝRSTVÍ

Stejně jako každý materiál i biomateriály přírodního i syntetického původu podléhají dříve či později rozkladu. V případě umístění do živé tkáně se jedná o tzv. biodegradaci. Pojem biodegradace je možno chápat jako biologické odbourávání organických i anorganických sloučenin za účasti živých organismů a jejich enzymatických pochodů (UNSD, 1997). Biodegradační pochody se realizují buď prostřednictvím biotransformace, kdy se látka katabolizuje (rozkládá na méně složité metabolity), nebo prostřednictvím mineralizace, kterou dochází k rozkladu na anorganické minerály, H_2O a aerobní CO_2 nebo anaerobní CH_4 .

Biodegradace materiálu obvykle zahrnuje procesy postupného, trvalého a nevratného znehodnocení či zhoršení vlastností materiálu. V případě této studie jsou však účinky biodegradace biomateriálu považovány za cílené a nezbytné pro další fungování zdravé tkáně. Po implantaci a osazení scaffoldu živými buňkami je třeba, aby se nová tkáň zcela obnovila a prorostla porézním scaffoldem do takové míry, že již scaffold nebude pro pevnost tkáně potřebný. Následuje řízená degradace, při které se scaffold za imunitních účinků a pomocí tělních tekutin zcela rozloží na banální sloučeniny a vyloučí se, aniž by intoxikoval organismus příjemce. Příkladem úspěšné cílené biodegradace může být dlouhodobá klinická studie, kterou publikoval v roce 2016 Jee-Wook Lee, ve které je zkoumán mechanismus tvorby kostí po zavedení šroubu z Mg-Zn-Ca slitiny. V 53 případech se podařilo prokázat, že díky řízené biodegradaci implantátu se vytvořila kalcifikační matrice, na jejímž základě se inicioval proces tvorby kosti, což usnadnilo hojení a umožnilo úplnou obnovu kosti během 1 roku. Proces hojení je zachycen na obr. 13 (Lee a kol., 2016).



Obr. 13: Hojení vřetenní kosti a úplná degradace šroubu z Mg slitiny během 1 roku (Lee a kol., 2016)

3.1 Příčiny vzniku degradačních procesů

Biodegradace je termín, který se používá v mnoha kontextech. Může označovat reakci, která se vyskytuje v průběhu několika minut až let. Může být navržena tak, aby k ní došlo po určité době po implantaci, nebo může být v horším případě neočekávaným dlouhodobým důsledkem biologického prostředí. Materiály implantátu, který je určen k degradaci, mohou měknout, solubilizovat (rozpuštět se) nebo podléhat biologickému rozpadu. Produkty degradace nesmí být pro tělo toxické a měly by být navrženy tak, aby nahradily farmakologickou funkci předešlé tkáně. Biodegradace se projevuje u všech typů biomateriálů, a lze ji tedy považovat za nejdůležitější vlastnost biomateriálu určeného k nahrazení poškozené tkáně (Ratner a kol., 2004).

Nelze konstatovat, že by podmínky lidského těla, jako je neutrální pH, nízký obsah soli a relativně nízká teplota, představovaly mírné prostředí. Podmínky biologického prostředí mohou být překvapivě dynamické a vést k postupné až rychlé degradaci mnoha materiálů. Dalo by se předpokládat, že největším problémem bude u implantátů mechanické zatěžování; pod tímto pojmem je možno chápat únavu materiálu během fyziologické zátěže. Mezi nejčastější příčiny degradace biomateriálů mechanickým zatěžováním patří procesy – deformace, zlomy, únavy a mechanická opotřebení materiálu (Kratochvíl a kol., 2005).

K biologické degradaci implantovaných materiálů dochází ve vodném prostředí iontů, které mohou být elektrochemicky aktivní vůči kovům nebo změkčovaným polymerům. Hydrolýza polymeru může vytvářet více hydrofilních metabolitů, což vede k celkové změně jeho struktury. Po vložení materiálu, který není tělu vlastní, jsou obranyschopnosti vyvolány specifické biologické mechanismy. Tkáňové buňky vylučují silná oxidační činidla a enzymy, které jsou zaměřeny na postupnou likvidaci implantovaného materiálu a proteiny adsorbující se na jeho povrch mohou zvýšit rychlost biodegradace. Nejsilnější degradační látky jsou koncentrovány na rozhraní mezi buňkou a materiálem, kde působí neředěné okolními tělními tekutinami. K pochopení příčin biologické degradace implantátů je však zapotřebí poznat všechny příčiny a faktory. Např. praskliny a trhliny vytvořené z důvodu pnutí otevírají povrch pro působení tkáňových metabolitů a enzymů, ale také mohou sloužit jako místa, která iniciují kalcifikaci, např. u kostních náhrad. Proudění tělních tekutin nebo jejich zkoncentrování na jednom místě také mohou zvyšovat rychlost biodegradace. Degradační produkty mohou měnit místní pH a stimulovat další reakci (Ratner a kol., 2004).

3.2 Důsledky biodegradace

Mezi důsledky biodegradace probíhající v lidském těle lze zařadit úbytek materiálu, snížení pevnostních vlastností nebo poškození daného implantátu či jeho částí. Pokud však bereme degradaci biomateriálu v těle jako děj cílený, můžeme hovořit o jeho využitelnosti. V případě náhrady tkáně pacienta scaffoldem je implantována „cizí“ látka do těla a snahou imunitních reakcí těla je daný materiál odbourat, a tedy biodegradovat. Důsledkem řízené biodegradace tak může být vyloučení podpůrného tkáňového implantátu z těla ven.

Metabolické procesy probíhající v lidském těle, které se vyvinuly v průběhu fylogeneze člověka, aby ochránily lidský organismus při napadení cizorodou látkou, se projevují také při implantování náhrady z biomateriálu. V případě imunologických reakcí člověka je třeba zvážit i specifickou autoimunitních reakcí, tedy že každé lidské tělo a jeho imunitní systém je unikátní. Nežádoucí reakce, které mohou po interakci s biomateriálem nastat u citlivých jedinců jsou například alergie, záněty, rozvoj infekce, trombózy, hemolýza, nebo dokonce karcinogeneze (Proctor, 2000). Výskyt infekce zabrání léčení zánětu a vzniká zánětlivá odpověď. Pokud dojde k chronické zánětlivé odpovědi, hojení ran je pozastaveno nebo není vůbec dokončeno. Kombinace poranění a přítomnosti cizího materiálu v těle výrazně zvyšuje riziko infekce, která se obtížně léčí a může vést k degradaci implantátu v důsledku jeho odmítnutí (Onuki a kol., 2008). Problémy spojené s infekcí v místě implantátu proto zůstávají aktivní oblastí výzkumu v řadě různých oborů, včetně mikrobiologie a materiálových věd (Chan a Mooney, 2008; Webster, 2006).

Při imunitní odpovědi tkáně v místě kontaktu s implantátem dochází:

- k nekróze, okolní tkáň postupně odumírá, pokud je materiál toxický;
- ke změně mocnosti tkáně, pokud je materiál netoxický a biologicky inaktivní;
- k tvorbě vazby mezi implantátem a okolní tkání, pokud je materiál netoxický a biologicky aktivní;
- k postupné regeneraci a náhradě okolní tkáně, pokud je materiál netoxický a rozpustný (Ratner a kol., 2004).

Imunitní systém je důležitý a ve smyslu ochrany těla systém komplexní, který reaguje zcela specificky. I když je imunitní systém důležitým obranným mechanismem, může působit autoimunitně, tj. způsobit poškození samotného hostitele (Anderson a kol., 2008). Otázka autoimunity je velmi důležitá při výběru samotného biomateriálu a při hodnocení jeho chování v organismu (Badylak, 2008). Při autoimunních reakcích může docházet až k odmítnutí implantátu a jeho postupnému vyhnívání, viz obr. 14.

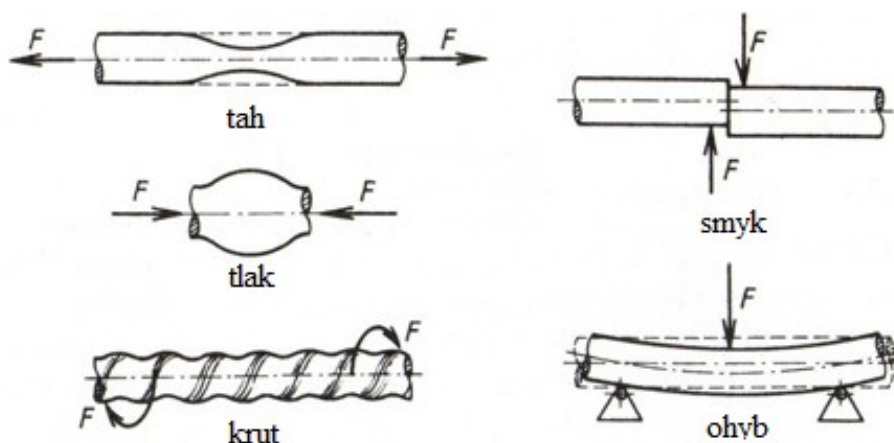


Obr. 14: Odmítnutí implantátu dolní končetiny (upraveno podle Neis-Beeckmann, 2016)

Alergické reakce postupují v těle různými mechanismy v návaznosti na cizorodé látky (Williams, 2008). Při hodnocení biomateriálů je důležité, aby se zabránilo stimulaci alergických reakcí produkty cílené biodegradace. Je třeba dbát na to, aby nedocházelo k tvorbě chemických látek, o nichž je známo, že se podílejí na vzniku alergií. Příkladem jsou některé z kovů, např. nikl či chróm, které jsou dnes známými alergeny při kontaktu s tělními tekutinami (Williams, 2009). Aby se vyloučila alergická reakce pacienta na danou náhradu ještě před její implantací do těla, je vhodné provést alergologické testy v závislosti na druhu implantátu. Provádějí se testy krevní, kdy se ověřuje reakce implantátu s jednotlivými složkami krve, nebo epikutánní, kdy je zkoušená látka nanášena dermatologem přímo na kůži pacienta.

3.3 Využití řízené biodegradace

Odbouratelné biomateriály mají četná využití v lékařství a chirurgii. Biodegradovatelné materiály jsou navrženy tak, aby se v těle odbouraly po předem stanovenou dobu od implantace, takže degradace dosahuje určité funkce. Biologicky rozložitelné přírodní polymery mohou být volně přizpůsobeny tak, aby dosahovaly požadovaných vlastností. U biodegradace buněčné matrice by taková rychlost měla být nastavena podle rychlosti obnovy nahrazené tkáně. Obecná kritéria pro výběr biomateriálu pro použití k vytvoření implantátu zahrnují především mechanické vlastnosti, jako je tah, tlak, krut, smyk a ohyb; viz obr. 15. Významná je také doba degradace potřebná pro konkrétní aplikaci.



Obr. 15: Mechanické vlastnosti implantátu (Hluchý a Kolouch, 2007)

Po naplnění svého účelu by měla v místě implantace simultánně proběhnout degradace a vytvoření nové tkáně. Dalšími vlastnostmi, které je třeba vzít v úvahu, jsou povrchové vlastnosti biomateriálů, především hydrofobicita a hydrofilnost, povrchový náboj, polarita a chování reaktivních chemických skupin. Přestože se mechanické vlastnosti a doba degradace biomateriálu liší podle specifické aplikace, je v každém případě základním požadavkem, aby biomateriály vykazovaly přiměřenou biologickou kompatibilitu, která je nezbytná pro jejich možné terapeutické aplikace. Pokud jsou zařízení navržena pro začlenění do tělesné tkáně, musí umožňovat silné interakce buněk a substrátů, včetně buněčné adheze, růstu a zachování specifického fenotypu přilnavých buněk. Na druhou stranu, pokud jsou biomateriály navrženy tak, aby nebyly integrovány do tělesné tkáně, musí být pro buňky neadhezivní (Saad a Suter, 2001).

Odbouratelné biomateriály jsou preferovanými kandidáty pro vývoj dalších terapeutických systémů, jako jsou trojrozměrné porézní implantáty pro tkáňová inženýrství nebo nosiče pro řízená uvolňování léčiv. Biomateriály přitahují pozornost pro svou dobrou biologickou kompatibilitu v lidském organismu. Rychlost degradace tkáňových inženýrských konstrukcí a nosičů léčiv by měla odrážet rychlost tvorby nových tkání, nebo být adekvátní pro řízená uvolňování bioaktivních molekul. Během uplynulého desetiletí bylo biodegradační chování různých biomateriálů široce zkoumáno *in vitro* a *in vivo* (Li a Li, 2014) a ukázalo se, že biodegradační vlastnosti buněčných matric mají zásadní význam pro dlouhodobý úspěch ve tkáňovém inženýrství. Rychlost degradace může ovlivnit mnoho buněčných procesů, včetně buněčného růstu, regenerace tkání a reakce hostitelské tkáně. Ideální rychlost biodegradace by však neměla překročit rychlost tvorby nové tkáně a snížení pevnosti implantátu by mělo být v souladu se zvýšením pevnosti rekonstruované tkáně, jinak by mohlo docházet ke změnám nové tkáně, což by mohlo mít v konečném důsledku negativní vliv na její regeneraci a mohlo by vést až k jejímu poškození (Liao a Cui, 2004).

Je tedy zřejmé, že rychlost degradace skeletu musí odpovídat rychlosti regenerace tkáně. Kromě toho musí být mechanické vlastnosti zachovány i během biodegradace tak, aby scaffold umožňoval buněčnou proliferaci a transport živin při vzniku nové tkáně. Bez dobrých degradačních vlastností buněčné matrice může být negativně ovlivněna buněčná proliferace, proto většina scaffoldu poskytuje nejen matici pro buněčnou proliferaci, ale také nezbytné živiny pro buněčný růst. Biodegradaci lze tedy považovat za účinný způsob úplného odstranění degradovatelných látek nebo jejich složek. Některé metody za účelem ovlivnění degradace a modifikace látky využívají enzymy, nebo dokonce mikrobiální konsorcia. Poptávka po specifických mechanických vlastnostech a rozložitelnosti přinesla současný zájem o modifikaci a funkcionalizaci látek prostřednictvím řízených procesů degradace (Gumel a kol., 2013). Úspěšný degradační experiment závisí na schopnosti kontroly hlavních parametrů jako je např. rychlost nebo specifita. Toho lze dosáhnout manipulací podmínek prostředí degradace, např. teploty, vlhkosti, modulací pH, koncentrací katalyzátoru nebo ozařováním. Metody přípravy látek před degradací mohou být také použity jako prostředky ovlivňující celý proces. Specifického výsledku degradace je možné dosáhnout kombinací těchto technik. Existuje také možnost kombinovat fyzikálně-chemické a enzymatické degradační kroky, což otevírá širší možnosti pro modifikaci látek.

3.4 Současné biodegradační metody

Pro provedení experimentu byly na základě studií (Lam a kol., 2008; Navarro-Baena a kol., 2016; Weilling a kol., 1992) zvoleny dva typy *in vitro* biodegradace – akcelerovaná a přirozená. Akcelerovaná degradace by měla přinášet rychlejší výsledky, ale aby bylo možné výstupy z ní přenést do reálného měřítka, byla pro kontrolu zvolena i degradace přirozená (Kirkpatrick a Mittermayer, 1990; Vojtová a kol., 2019). Polymerní biomateriály mohou být degradovány buď hydrolytickou degradací v reakci s peroxidem vodíku (H_2O_2), kdy dochází ke štěpení funkčních skupin pomocí molekul vody, nebo degradací oxidativní, kdy volné radikály generované polymerem přímo iniciují jeho oxidaci. Během prvních dnů implantace dochází v místě nahrazení tkáně k imunitní reakci, kdy reagují především lymfocyty a makrofágy na přítomnost cizorodých látek a vytvářejí silnou imunitní odpověď v podobě uvolnění volných radikálů (Mabilleau a Sabokbar, 2008).

Biomateriály uvažované pro implantáty jsou obvykle nejprve testovány *in vitro* v médiích simulujících tělesnou tekutinu a následně metodami *in vivo* ve vhodném živém zvířecím organismu. Testy jsou zaměřeny na jejich fyzikální, chemické a mechanické vlastnosti a poskytují tak základní informace umožňující posoudit vhodnost materiálu pro implantaci do lidského organismu. Při *in vitro* zkouškách je materiál vystaven účinkům vodných roztoků, které simulují anorganickou část krevní plazmy v přítomnosti nebo nepřítomnosti buněčných kultur a zkoumá se interakce jeho povrchu s roztokem. Médium označené jako simulovaná tělní tekutina (SBF, *Simulated Body Fluid*) v literatuře patří k nejoblíbenějším modelovým řešením simulujícím právě anorganickou složku lidské krve. Zkoumají se jak změny koncentrace jednotlivých složek, tak i změny povrchu vzorků. Vzhledem k tomu, že podmínky, za kterých probíhají experimenty popsané v literatuře ještě nebyly zcela standardizovány, je vždy nutné je specifikovat. Lze mezi ně zařadit např. teplotu, složení a pH média, dobu a způsob expozice, poměr povrchové plochy materiálu k objemu roztoku loužení a další (Helebrant a kol., 2002).

Vhodnou předlohou pro testování biodegradability polymerních biomateriálů je Evropská norma ISO 10993-13. Tato norma je rozdělena na dvě části, přičemž první se váže k akcelerovaným testům degradace a druhá k testům degradace v reálném čase. Principem zrychlené zkoušky je ponoření biomateriálu do simulované tělesné tekutiny při teplotě okolo 37 °C po dobu 2 – 60 dnů. Tento test vede k degradaci vzorku, který lze

následně analyzovat pomocí hmotnostní bilance a molekulární rovnováhy. Pokud informace získané z akcelerovaného testu nepostačují k odůvodnění použití materiálu, přejde se k testování biomateriálu v reálném čase. Tento test je navržen tak, aby napodoboval prostředí *in vivo* v reálném čase. Proto se provádí při standardní tělesné teplotě 37 °C a pro analýzu jsou vyžadovány čtyři různé časové periody. Po uplynutí těchto period je použita stejná analýza hmotnostní bilance a molekulové hmotnosti (Das a kol., 2012).

Vhodná metodika pro experimentální část práce byla vytvořena na základě rešerše podobných biodegradačních studií, jejichž výčet je uveden v tab. 5.

Tab. 5: Biodegradační metody

materiál	degradační metoda	autor
PLA/PHB	+ Lapol 108; kompostování (56 dnů)	Abdelwahab a kol., 2012
PLA/PHB	+ limonen; kompostování (58 °C, 35 dnů)	Arrieta a kol., 2014a
PLA/PHB	+ PEG/ATBC; kompostování (58 ± 2 °C, 28 dnů)	Arrieta a kol., 2014b
COL/CHI/ALP	<i>in vitro</i> bakteriální koleganáza (<i>C. histolyticum</i>)	Berteau a kol., 2016
PHB	lipáza, THAM (37 °C, pH 7,7, 3 měsíce)	Boskhomdziev a kol., 2010
PHB	kompostování (23 ± 1 °C, 6 měsíců)	Bucci a kol., 2007
PLA/PHB	biodegradace s využitím čistírenských kalů	Dvořáčková a kol., 2017
PLLA, PHB	Sörensenův PBS (37 °C, pH 7,4, 12 měsíců)	Freier a kol., 2002
PLA	degradace depolymerázou, SBF (8 měsíců)	Guo a kol., 2017
slitiny Zn/Mg	<i>in vitro</i> ADT, umělá moč (37 ± 1 °C, 80 rpm)	Champagne a kol., 2019
PLA	+ chitosan; term. kompost. (58 ± 5 °C, 80 dnů)	Kalita a kol., 2019
PCL	<i>in vitro</i> ADT, PBS a NaOH (37 °C, 6 týdnů)	Lam a kol., 2008
PLA, PHB(HHx)	hydrolytická degradace, SBF (37 °C, 21 týdnů)	Li a kol., 2008
PHB	+ sepiolit; MSM (30 °C, 150 rpm, 4 týdny)	Masood a kol., 2018
PLA/PCL	<i>in vitro</i> PBS (37 °C, pH 7,4), kompost. (4 týdny)	Navarro-Baena a kol., 2016
PCL	PBS + lipáza (37 °C, pH 7,4, 5 % CO ₂ , 28 dnů)	Neumann a kol., 2019
kovové biomat.	HBSS (37 ± 2 °C, pH 7,4, 13 týdnů)	Oriňáková a kol., 2015
PLA	UVC + kompost. + bakterie (58 ± 2 °C, 45 dnů)	Pattanasuttichonlakul, 2018
PHB	ADT v kompostu s bakteriemi (25 °C, 30 dnů)	Savenkova a kol., 2000
PLGA/PEG/PLGA	NaCl + HCl (37 °C, pH 2,0 – 2,2, 14 dnů)	Vojtová a kol., 2019
PLA, PCL, PHB	hydrolytická degr., pufr (37 °C, and pH 7,4)	Zhang a kol., 1995

3.4.1 Akcelerovaná biodegradace *in vitro*

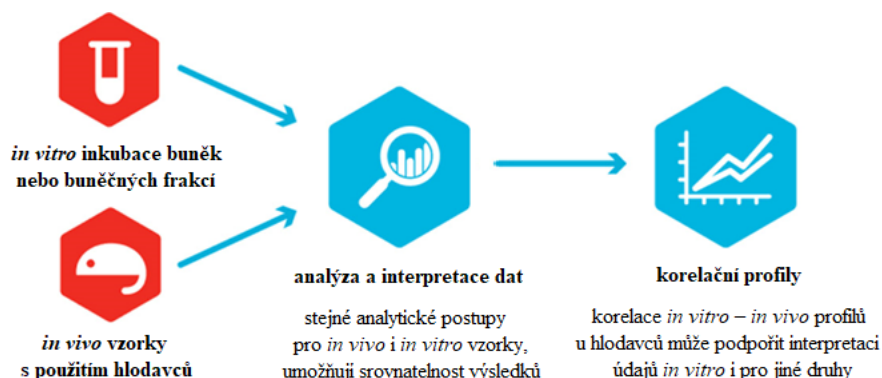
Zrychlené testy degradace jsou široce používány k rychlému posouzení spolehlivosti materiálů. V takových testech jsou výrobky vystaveny zvýšeným zátěžovým podmínkám jako je např. snížené pH, zvýšená teplota nebo rychlejší proudění (simulované promícháváním pomocí míchačky nebo třepačky) nebo jejich kombinace. Plánování optimálních testů a následná analýza výstupních dat vzbuzují značnou pozornost ze strany výzkumníků a inženýrů testujících kvalitu a spolehlivost biomateriálů (Zhao a Xie, 2017). Zkušební informace z dobře naplánované a spolehlivé biodegradace mohou poskytnout užitečné vodítko pro předpověď životnosti daného materiálu, a tedy také implantátu. Hlavní výhody spočívají ve zkrácení časového intervalu testování, snížení nákladů zkoušky a rychlejším dodání výsledků. Mezi nevýhody však patří vyšší cena prototypu a vybavení k monitorování výsledků a složitější sestavení zkoušky (Pan a Crispin, 2011; Zhao a kol., 2018). Reliabilitu akcelerovaných testů je však třeba ověřit. Nejjednodušším způsobem kontroly je srovnání se standardním neakcelerovaným testem. Ze standartního testu vycházejí data pro vytvoření a kontrolu testu akcelerovaného. Pokud je odchylka obou testů v akceptovatelných hodnotách, lze pokračovat pouze v akceleračním testu, který se později může opakovat bez dalšího porovnání s testem neakcelerovaným (Dodson a Schwab, 2003).

V práci byla u experimentu akcelerované degradace ustanovena teplota na neměnných 37 °C, ale pH bylo sníženo na hodnotu 4,5 (Bono a Reygaert, 2019; Demirbas a kol., 2015; Hara a kol., 2012; Hohlbrugger a Lentsch, 2017; Maalouf a kol., 2010; Oriňáková a kol., 2015), což je nejnižší možná hodnota, která může v močovém měchýři nastat. Tento typ degradace je většinou realizován po kratší dobu, aby bylo pak možno jej snadno vztáhnout k přirozené degradaci. Pro přirozenou degradaci bývá už nastavení podmínek mírnější a co nejvíce připodobněné reálným podmínkám, tj. teplota 37 °C a pH okolo 7,2. U obou metod musí být vždy vzorky v předem dané dny vyjmuty z médií, vysušeny do konstantní hmotnosti a zváženy. Nastavení teplot a doba sušení se může lišit v závislosti na materiálu. Při porovnávání metod je také důležité, aby byly vzorky vždy degradovány ve stejném množství média, které bylo v tomto případě na základě přiložených studií ustanoveno vždy na 100 ml.

3.4.2 Přirozená biodegradace *in vitro*

Biodegradace je definována jako postupné rozložení materiálu zprostředkovaného specifickou biologickou aktivitou. Studie *in vitro* týkající se interakce polymerů s různými enzymatickými roztoky naznačují, že existuje možnost enzymem indukované degradace. Při mechanickém namáhání implantátu se v některých biopolymerech vytváří trhliny nebo praskliny na povrchu materiálu, které jsou místem pro první enzymatickou reakci a další biodegradaci (Weilling a kol., 1992). Metody *in vitro* poskytují nezbytný a užitečný doplněk k *in vivo* studiím při testování potenciálních implantologických biomateriálů. Jednou z nejdůležitějších funkcí je screening toxických účinků biomateriálů. Rozšíření *in vitro* testovacích metod může nabídnout metodu přizpůsobení biomateriálů pro specifické *in vivo* aplikace. Je zde ale třeba zdůraznit, že *in vitro* experimenty nemohou nahradit následné *in vivo* testování. Oba typy testování jsou tedy nezbytné pro ověřování vlastností potenciálních biomateriálů (Kirkpatrick a Mittermayer, 1990).

Korelace mezi *in vivo* a *in vitro* experimenty je definována Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) jako prediktivní matematický model, který popisuje vztah mezi *in vitro* vlastnostmi jako je rychlost a míra degradace a relevantní *in vivo* odezvou; ilustrováno na obr. 16. *United States Pharmacopeia* (USP) definuje korelaci mezi *in vivo* a *in vitro* (*In Vitro/In Vivo Correlation – IVIVC*) jako stanovení vztahu mezi biologickou vlastností nebo parametrem odvozeným z biologické vlastnosti produkované formou a fyzikálně-chemickou charakteristikou stejné biologické vlastnosti (Qui a Duan, 2017). Je důležité, aby se všechny vzorky analyzovaly najednou pomocí stejné analytické metody, aby se umožnila úplná srovnatelnost výsledků. Korelace *in vitro* a *in vivo* profilu pak může podporovat interpretaci údajů *in vitro* pro různé zvířecí druhy.



Obr. 16: Srovnání *in vitro* a *in vivo* testů (upraveno podle Qui a Duan, 2017)

3.4.3 Biodegradační média

Výběr vhodného média je založen na druhu a rozpustnosti biomateriálu a může se lišit složením, vlastnostmi i rychlostí působení. Pro biodegradační experimenty se využívají média od mírných fyziologických roztoků, fosfátových pufrů (PBS), přes různé typy roztoků připodobňujících reálné fyziologické prostředí jako je simulovaná tělní tekutina (SBF), Ringerův roztok, Hankův roztok, pufrový roztok trisaminomethanu, minerální solné médium nebo jako byla v tomto experimentu močovina a moč. Může být ale využito i různých agresivnějších enzymatických či bakteriálních roztoků (Berteau a kol., 2016; Eliaz, 2012).

Simulovaná tělní tekutina

Simulovaná tělesná tekutina (SBF) je roztok s koncentrací iontů blízkou koncentraci lidské krevní plazmy, udržovaný za mírných podmínek pH a stejné fyziologické teploty. Složení SBF bylo představeno Kokubo a kol. (Kokubo a kol., 1990) za účelem hodnocení změn na povrchu bioaktivní sklokeramiky. Autoři došli k závěru, že SBF musí být pro experimenty pečlivě vybrána, jelikož sebemenší chybná hodnota může pokus zmařit. Později byla navržena média pro buněčné kultury v kombinaci s některými metodikami jako alternativa ke konvenční SBF při hodnocení bioaktivity biomateriálů (Lee a kol., 2011).

Fyziologický roztok

Základní fyziologický roztok obsahuje 9 g NaCl rozpuštěné v 1 litru vody. Podává se v infuzi do žil jako náhrada za ztracené tekutiny a jako rozpouštědlo pro řadu léčiv. Je důležité, že má přibližně stejnou osmolalitu jako krevní plasma, protože roztoky s výrazně vyšší osmolalitou mohou způsobit záněty žil. Osmolarita krevní plazmy se pohybuje okolo 275 – 295 mmol/l a u fyziologického roztoku je to 308 mmol/l. Proto se podávají do některé z velkých žil, jako je např. podklíčková, kde větší průtok krve ihned roztok naředí.

Pufrovaný fyziologický roztok (PBS)

Pufrový roztok (PBS) je běžně používaný v biologickém, chemickém nebo medicínském výzkumu. Takzvaný pufrovaný fyziologický roztok (Phosphate Buffered

Saline) je v oblastech biodegradace jedním z nejvíce používaných roztoků. Jedná se o vodný roztok soli obsahující hydrogenfosforečnan sodný, chlorid sodný, někdy chlorid draselný a dihydrogenfosforečnan draselný. Pufr pomáhá udržovat konstantní pH. Osmolarita a koncentrace iontů odpovídají koncentracím v lidském těle. Využívá se ke stabilizaci pH v neutrální až mírně zásadité oblasti; výsledné pH 6 – 8,5 (Schille a kol., 2015).

Močovina $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$

Močovina (urea) je v organismu kvantitativně nejvýznamnějším degradačním produktem aminokyselin a proteinů. Vzniká v játrech z amoniaku uvolněného deaminačními reakcemi při metabolismu aminokyselin, ale vylučuje se především ledvinami a sice glomerulární filtrací a tubulární resorpcí. Dobře prostupuje buněčnými membránami, takže je její koncentrace shodná v plazmě i intracelulární tekutině. Při zvýšeném vylučování moči, tzv. diuréze jsou její hodnoty nižší a při sníženém se naopak zvyšují. Koncentrace močoviny v těle je závislá na obsahu bílkovin přijatých v potravě, hydrataci organismu, graviditě, na množstvím vyloučeném ledvinami a na metabolické funkci jater (Fontana, 2014). Močovina je tedy vždy hlavní sledovanou látkou při podezření na selhávání ledvin. Pro pokus byla použita močovina o molekulové hmotnosti $M=60,06 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Sloučenina obsahovala 0,002 % Cl, 0,005 % SO_4 , 0,0005 % Pb a 0,0005 % Fe.

Lidská moč

Tvorba moči je významný děj pro celý organismus, protože je díky ní upravována nejen acidobazická rovnováha, ale i osmolarita krve, složení plazmy a celkový objem tekutin. Tím ovlivňuje v podstatě všechny buňky v těle. Zdravý dospělý člověk vyprodukuje v závislosti na příjmu tekutin 1,5 – 2 litry moči za den, na čemž se podílejí mechanismy – glomerulární filtrace, tubulární resorpce a sekrece. Konečným produktem všech těchto mechanismů je tzv. definitivní moč. Je to charakteristicky zapáchající, čirá, zlatožlutá tekutina o specifické hmotnosti $1003 - 1038 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$, pH pohybujícího se v rozmezí 4,5 – 8,0. Co se týče látkového složení, moč obsahuje přibližně $100 - 250 \text{ mmol/l Na}^+$, $25 - 100 \text{ mmol/l K}^+$, 135 mmol/l Cl^- , Ca^{2+} , kreatinin, kyselinu močovou, močovinu a další látky. V moči zdravého člověka se nevyskytují bílkoviny ani glukóza (Fontana, 2014).

4 EXPERIMENTÁLNÍ BIODEGRADACE ZVOLENÉHO BIOMATERIÁLU

Cílem experimentální části práce bylo ověřit schopnost biodegradability zvoleného biomateriálu, v tomto případě ze směsi PLA/PHB v simulovaných podmínkách lidského organismu. K experimentům byly zvoleny dva způsoby biodegradace – akcelerovaná a přirozená. Akcelerovaná degradace byla testována v laboratoři JA418 a JA419 Katedry environmentálního inženýrství Hornicko-geologické fakulty VŠB – TUO a přirozená degradace byla realizována v laboratorních prostorách L01 a L04 Laboratoria aditivních biomedicínských procesů ve spolupráci s Katedrou biomedicínského inženýrství Strojní fakulty Technické univerzity v Košicích.

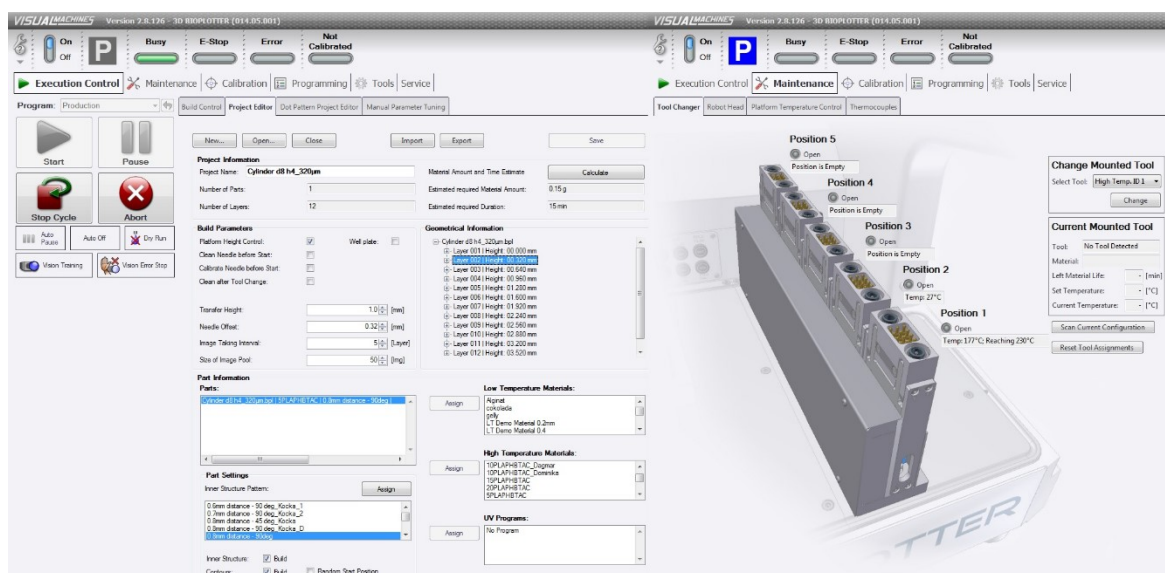
Experimenty v laboratoři Technické univerzity v Košicích

Pro experimentální přirozenou degradaci bylo využito přístrojové vybavení laboratoří Katedry biomedicínského inženýrství TUKE. V laboratoři aditivních biomedicínských procesů L04 probíhal 3D tisk (obr. 17) a v laboratoři L01 probíhala následná přirozená biodegradace v inkubátoru Binder.



Obr. 17: Laboratórium aditivných biomedicínských procesov

K modelování a následnému 3D tisku byly využity softwary: Magics 16.2 pro samotnou konstrukci a návrh vzorku, Bioplotter RP 3.0 pro vkládání objektů na platformu a Visual machines pro následné ovládání Bioplotteru, jak je ilustrováno na obr. 18. Po vymodelování správného tvaru je třeba nejprve správně nastavit tiskové parametry jako je např. teplota zahřátí cartridge a tím pádem i materiálu, rychlost tisku a tlak v tiskové hlavě. Je také potřeba zvolit správný průměr jehly. Existují různé druhy tiskových hlav, např. nízko nebo vysokoteplotní; tiskárny většinou umožňují i použití několika hlav najednou.



Obr. 18: Uživatelské rozhraní Visual Machines pro nastavení tiskových parametrů

Seznam použitého laboratorního vybavení a přístrojů je uveden v tab. 6.

Tab. 6: Seznam použitých přístrojů a materiálu pro přirozenou biodegradaci z TUKE

název přístroje	typ	výrobce
3D biotiskárna	3D-Bioplotter®	EnvisionTEC, Německo
chladič platformy	Minichiller	Huber, USA
sušící váha/analyzátor vlhkosti	MA 50/1.X2.A	Radwag, Polsko
inkubátor/sušící pec	Binder	Otto Bock Healthcare GmbH, Německo
třepačka Orbital Shaker	PSU-10i	BIOSAN, Lotyšsko
pH metr	FiveEasy Plus	Mettler Toledo, USA
další laboratorní materiál	Petriho misky, Erlenmeyerovy baňky, pinzety, odměrné válce a kádinky	

Experimenty v laboratoři VŠB – Technické univerzity Ostrava

Pro experimenty akcelerované degradace bylo využito přístrojové vybavení laboratoře JA418 a JA419 Katedry environmentálního inženýrství Hornicko-geologické fakulty VŠB – TUO (obr. 19).



Obr. 19: Laboratoř JA418/419 Katedry environmentálního inženýrství

Seznam použitých přístrojů je uveden v tabulce č.7.

Tab. 7: Seznam použitých přístrojů a materiálu pro akcelerovanou degradaci z VŠB-TUO

název přístroje	typ	výrobce
horkovzdušná sušárna	Ecocell® 55 Standard	BMT Medical Technology, ČR
horkovzdušný sterilizátor	Stericell® 55 Standard	BMT Medical Technology, ČR
elektronické analytické váhy	Analytical Plus 250D	OHAUS, Švýcarsko
chladnička	Intuition SpacePlus	Electrolux, Švédsko
termostat	ET 618-4-40°C	Lovibond, Velká Británie
pH metr	pH 3110	WTW, Německo
digitální teploměr	GTH 1150	Greisinger electronic, Německo
další laboratorní materiál	Petriho misky, jednorázové váženky, pinzety, odměrné válce, Erlenmeyerovy baňky, skleněné tyčinky, kádinky	

4.1 Materiál a metodika

Testované vzorky biomateriálu ze směsí polymléčné kyseliny (PLA) a polyhydroxybutyrátu (PHB) byly vyrobeny na Slovenské Technické univerzitě v Bratislavě na Fakultě chemické a potravinářské technologie.

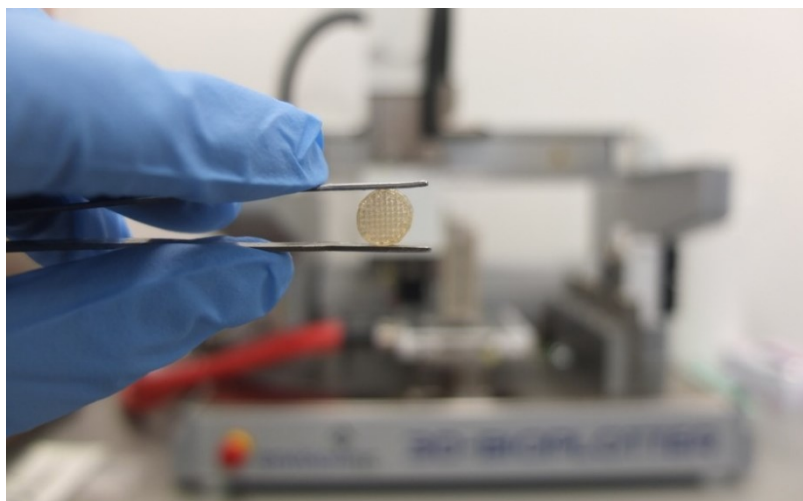
4.1.1 Charakteristika směsí PLA/PHB a příprava 3D scaffoldů

Biologicky odbouratelné polymerní směsi se připravovaly pomocí laboratorního segmentálního dvojzávitového míchacího a vytlačovacího zařízení se vzájemně se překrývajícími a souhlasně se otáčejícími šneky od firmy LABTECH (Thajsko). Zařízení bylo vytemperováno na pracovní teplotu 160 ° C a otáčky byly nastaveny na hodnotu 100 otáček za minutu (rpm). Na výstupu ze zařízení byl granulát ochlazen ve vodě. Na základě studie Findrik Balogové z roku 2018 (Findrik Balogová, 2018) byla vykonána selekce vhodných poměrů sloučenin v materiálu, který byl následně podroben dalšímu testování cytotoxicity. Autorka při testování kontaktní toxicity a pozorování růstové aktivity buněk dospěla k závěru, že byl u některých směsí pozorován inhibiční účinek, což bylo způsobeno použitým změkčovadlem. Proto byla pro testování biodegradability použita směs obsahující PLA/PHB v poměru 85:15 s obsahem změkčovadla triacetinu (TAC) 0 %, 5 % a 10 % v celkovém objemu. Triacetin je chemická sloučenina, která se běžně používá jako přídatná látka ve farmacii a v potravinářství pro svou zvlhčovací, změkčovací a rozpouštěcí funkci. Při testování účinku triacetinu jako změkčovadla byl prokázán jeho vliv na viskozitu polyesterů, díky čemuž je možné jejich zpracování při nižších teplotách. Každá z biotiskových technik vyžaduje specifické parametry pro tisk, ale i specifickou formu a skupenství materiálu. Směs PLA/PHB byla použita ve formě granulátu; viz obr. 20.



Obr. 20: Granulát PLA/PHB (vlevo reálná velikost, uprostřed zv. 10x4, vpravo zv. 10x10)

Pro zhotovení vzorků scaffoldů byl použit 3D Bioplotter EnvisionTEC, který pracuje principem EBB (extrusion-based bioprinting), což je pneumatické vytlačování materiálu z tiskové hlavy. Materiál je v tiskové hlavě (cartidge) zahřátý na požadovanou teplotu a následně vytlačený vrstvou po vrstvě do požadovaného tvaru. Pro testování byly speciálně vytvořeny porézní vzorky cylindrického tvaru o průměru 8 mm a výšce 4 mm (obr. 21) na základě srovnání předchozích podobných degradačních *in vitro* studií (Barbeck a kol., 2017; Franks a kol., 2000; Vojtová a kol., 2019; Wu a Ding, 2004; Zhang a Ma, 2004). Tato velikost byla zvolena také na základě velikosti lidské močové trubice, u které by implantát měl v budoucnu sloužit k léčbě zánětů močové trubice, tzv. uretritid.



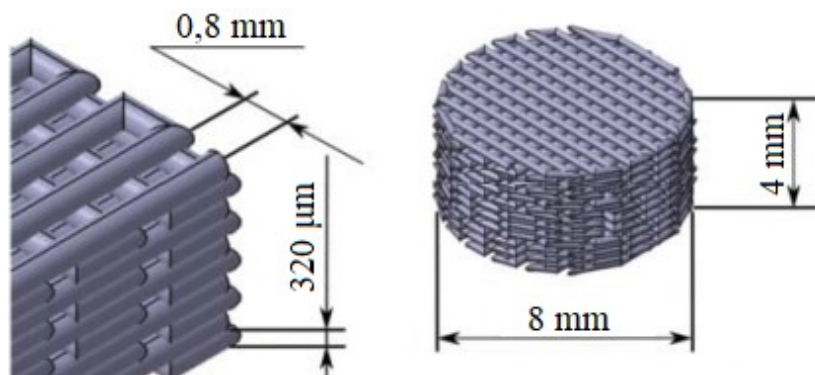
Obr. 21: 3D Scaffold ze směsí PLA/PHB (v pozadí 3D BioPlotter)

Nejprve byla každá směs po dobu 1 hodiny sušena při teplotě 70 °C (obr. 22), kvůli hydrofilním vlastnostem (vázání vzdušné vlhkosti), kterou se vyznačuje složka PHB.



Obr. 22: Sušení a vážení vzorků

Aby byla zajištěna stejná velikost vzorků, všechny byly vytvořeny stejnou tryskou (jehlou) o průměru 0,4 mm. Velikost hrubosti vrstvy odpovídala 80 % průměru trysky, tedy 320 μm . Jeden vzorek se sestával z 12 vrstev, každé o výšce 320 μm . Vzdálenost středů jednotlivých pásů vrstev od sebe činila 0,8 mm; viz obr.23.



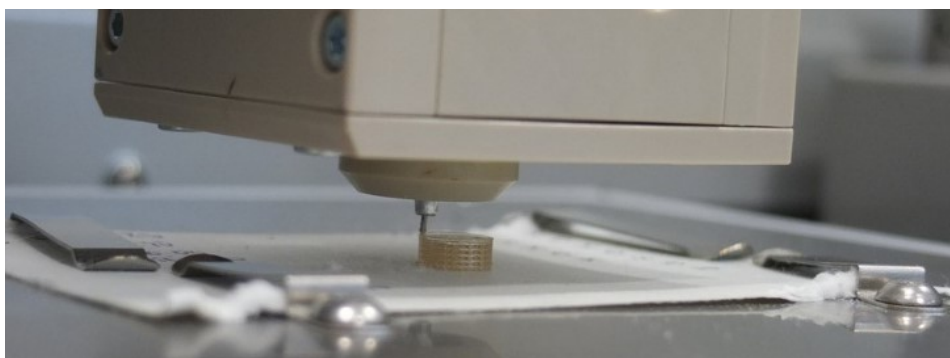
Obr. 23: Rozměry 3D scaffoldů z PLA/PHB (upraveno podle Neumann a kol., 2019)

Pro biotisk byla zvolena vysokoteplotní hlava s kovovou cartridge. Vzhledem k tomu, že procentuální objem příměsi změkčovala mírně mění celkové vlastnosti směsi, bylo potřeba podmínky u každé série nastavit individuálně. Důležité bylo nahřátí materiálu na počáteční teplotu 230 °C, aby se materiál roztekl a homogenizoval, poté se teplota postupně snižovala. Platforma, na kterou byl prováděn tisk byla vyhřátá na 50 °C, aby se zamezilo přilepení vzorku k podkladu. Teplota musí být správně nastavena, aby se zabránilo i sklouznutí vzorku z platformy. Protože se však v průběhu tisku vlastnosti směsi mění, nejsou stálé, je třeba je přizpůsobit, jak je zaznamenáno v tab. 8.

Tab. 8: Nastavení tiskových parametrů

obsah TAC	0 %	5 %	10 %
teplota a čas zahřívání	230 °C/2 min 200 °C/3 min 190 °C/2 min 185 °C/5 min	230 °C/2 min 200 °C/3 min 190 °C/2 min	230 °C/5 min 200 °C/2 min
tlak [p]	7 – 8,2 bar	8,0 – 8,2 bar	7,5 – 8 bar
rychlost tisku [v]	1,5 – 3 mm/s	1,3 – 2,5 mm/s	2 – 5 mm/s

Tisk záleží na hustotě materiálu a použitém tlaku. Jelikož bylo třeba, aby vzorky byly co nejrepresentativnější a nejpresnější, byla zvolena pomalejší rychlost tisku. Z důvodů postupné degradace materiálu při teplotě 190 °C bylo však třeba materiál vždy 1x vyměnit, aby byly vzorky v co nejlepším stavu. Nastavení správné teploty materiálu je pro tisk jednou z klíčových vlastností, protože po více než hodinovém ohřívání nad 190 °C začíná materiál degradovat – zkaramelizuje, ztmavne a už jej není možné použít a je třeba jej vyměnit. Po vytištění vzorku musí materiál chvíli zchladnout, než se může oddělit od platformy, aby se zabránilo jeho deformaci. Bioplotter je schopen při správném nastavení vytisknout cca 5 vzorků za hodinu. Na obr. 24 je zachycen tiskový proces pomocí extruze. Tato technika umožňuje vyšší rychlost tisku, možnost využití vyšší hustoty buněk v bioinkoustu, a relativně menší poškození buněk ve srovnání s jinými biotiskovými technikami.



Obr. 24: 3D tisk směsí PLA/PHB

Celý tiskový proces trval 4 dny, jelikož v průběhu jednoho naplnění cartridge materiálem bylo možné vytisknout jen cca 15 vzorků. Celkem bylo vytvořeno 20 vzorků od každého objemu změkčovadla TAC, viz obr. 25



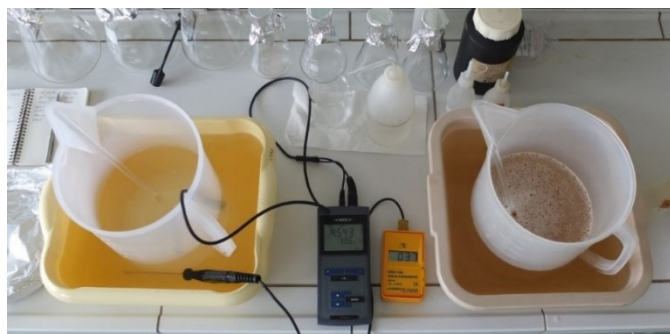
Obr. 25: Scaffoldy ze směsí PLA/PHB (zleva 0, 5 a 10 % TAC)

4.1.2 Akcelerovaná degradace

Vzorky byly rozděleny na dvě části – pro akcelerovanou degradaci bylo z každé série vybráno 6 vzorků a pro degradaci přirozenou bylo z každé série vyděleno 14 vzorků pro dvoutýdenní degradaci. Aby bylo možné porovnat výsledky *in vitro* biodegradace a biodegradace akcelerované, byla testována různá degradační média. Pro akcelerovanou degradaci byla zvolena močovina od firmy PENTA s.r.o. (ČR) a lidská moč o extrémním pH 4,5.

Pro účely experimentu byla odebírána moč zdravého dárce po dobu 34 h do sterilizovaných plastových lahví a byla uchovávána při teplotě 2 – 8 °C, při které by měla být stabilní po dobu 7 dnů. Dárce byl za účelem zabránění zkreslení výsledků podroben lékařské kontrole před odběrem vzorku, kde byla testována jeho krev na přítomnost pohlavních nemocí (HIV, RRR, HCV a HBSAg – všechny negativní), poté byl proveden výtěr z krku, kde byla nalezena běžná flóra horních cest dýchacích a bylo také provedeno základní chemické vyšetření moči (pomocí papírku HeptaPhan), které bylo rovněž negativní. Krevní obraz byl rovněž v pořádku a nevykazoval žádné anomálie, tudíž mohla být pro tuto studii použita jeho moč. Dárce po dobu odběrů nepožíval žádná léčiva či výživové doplňky, aby nebyly výsledky zkreslené. Toto biodegradační médium bylo zvoleno pro účely kontroly výsledků v reálných podmínkách.

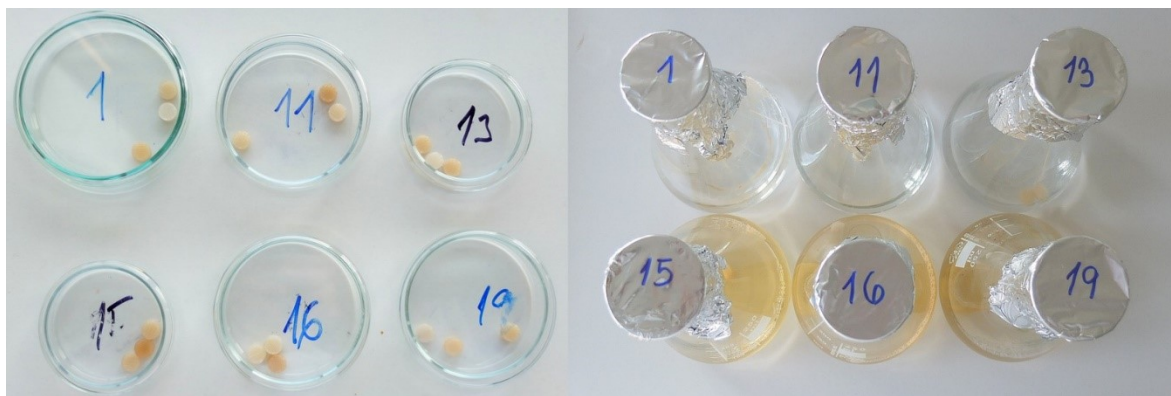
Prvním pokusem byla akcelerovaná biodegradace. První den bylo třeba namíchat média – močovinu a moč o pH 4,5. To se ukázalo mírně problematickým, jelikož musí média mít konstantně stejné pH, aby mohly degradovat vzorky při dané teplotě, nicméně v laboratoři bylo pouze 23°C. Pro většinu chemikálií rozpuštěných ve vodě platí, že se zvýšenou teplotou se mění jejich pH. Média se tudíž musela nejprve vytemperovat na 37 °C a pak se přistoupilo teprve k upravování jejich pH; viz obr. 26.



Obr. 26: Proces úpravy pH médií (vlevo močovina, vpravo lidská moč)

Pro množství surové granulované močoviny se vycházelo z úvahy, že dospělý zdravý člověk vyloučí během 24 h 1,5 l moči, ve které je přibližně 30 g močoviny (Chamuah a kol., 2019; Liu a kol., 2012; Saatkamp a kol., 2016), proto bylo naváženo 43,9999 g močoviny a následně rozpuštěno v 2200 ml destilované vody. Následně se média umístila do termostatu, kde se hodinu zahřívala na teplotu 37 °C, po této době byla vyjmuta a jejich pH bylo upraveno pomocí 1 %, 4 % a 10 % kyseliny chlorovodíkové (HCl) na 4,5 zatímco byla stále udržována na teplotě 37 °C pomocí vodní lázně. HCl byla zvolena na základě parametrů PLA/PHB uváděných výrobcem a sice, že je směs rozpustná v roztocích s přídavkem chlóru. Roztoky se při regulaci pH nechaly vždy chvíli odpočinout znovu v termostatu, aby bylo možné pH změřit zcela přesně. Kvůli rozdílnému chování roztoků, jako byla v tomto případě močovina a reálných, tedy lidská moč je třeba postupovat při snižování pH opatrně, jelikož stejné objemy přidané HCl nemusí působit ve stejném množství stejně. Po úpravě pH na 4,5 byla následně média opět umístěna do termostatu, aby se pH do dalšího dne ustálilo.

Vzorky byly rozděleny do sterilních Petriho misek dle obsahu TAC a sušeny v sušárně do konstantní hmotnosti, cca 1,5h při teplotě 70 °C (hodnota uvedená výrobcem) a poté ponechány v sušárně přes noc, aby se již neměnila jejich vlhkost. Není však dobře objasněno, kdy ještě ubývá hmotnost z důvodu vypařování vody a kdy už ubývá hmotnost z důvodu vypařování materiálu. Na základě této úvahy byla tedy zvolena teplota 70 °C. Další den byly vzorky po vytažení ze sušárny okamžitě zváženy. Následně byly všechny najednou umístěny vždy podle rozdílného obsahu TAC do sterilních baněk obsahujících 100 ml daného média. Aby bylo možno se vzorky dobře manipulovat a nedošlo k jejich záměně, byly důkladně označeny a umístěny podle sérií do samostatných misek nebo baněk; viz obr. 27.



Obr. 27: Označování vzorků v Petriho miskách (vlevo) a Erlenmeyerových baňkách (vpravo)

Tyto baňky byly vloženy do termostatu, kde byly následně ponechány 7 hodin, přičemž každou hodinu byla měněna média, aby nedocházelo k nasycení roztoků a byly zachovány konstantní podmínky, tedy pH 4,5 a teplota 37 °C. Média se vzorky byla občasně promíchána, aby bylo simulováno proudění tělních tekutin. Těmito podmínkami bylo simulováno prostředí lidského organismu. Spolu s baňkami byla do termostatu umístěna i zásobní média, ze kterých se vždy po hodině doplňovalo do baněk (obr. 28).



Obr. 28: Inkubace vzorků a médií v termostatu během akcelerované degradace

V průběhu experimentu bylo přesně každou hodinu měněno médium. Nejprve se staré médium odstranilo, vzorky se propláchly v destilované vodě, poté se znovu vložily do Erlenmeyerových baněk a bylo k nim přidáno 100 ml daného média. U médií bylo pravidelně sledováno pH a v případě potřeby upravováno, aby byly podmínky stále konstantní. V průběhu pokusu byly zaznamenány změny pH obou médií vlivem teploty a po měření vždy upraveny na hodnotu 4,5 za účelem zachování konstantních podmínek. Močovina měla tendenci zvyšovat své pH až na 5,8, zatímco moč byla stálejší a pH se zvyšovalo v rámci desetin; maximálně na 4,6.

Po skončení pokusu byly vzorky promyty destilovanou vodou, vloženy do Petriho misek a znovu umístěny do sušičky, kde byly sušeny 3 h při 70 °C do konstantní hmotnosti a kde byly následně ponechány přes noc, aby mohla teplota postupně klesnout, ale zároveň vzorky nenavlhly. Další den bylo provedeno opětovné vážení vysušených vzorků.

4.1.3 Přirozená degradace

Dalším pokusem pro srovnání a kontrolu byla degradace přirozená. Pro tento typ biodegradace byla zvolena stejná močovina a fyziologický roztok od firmy Envirolab s.r.o. (SR). Protože se moč při vyšších teplotách a dlouhodobé expozici rozkládá, může dojít ke vzestupu pH do alkalické oblasti a redukci močoviny, vzorky byly tentokrát testovány znovu už jen v močovině. Pokus byl opakován při stejném pH, tedy 4,5, 37 °C a zajištěním konstantního promíchávání pomocí magnetické míchačky s hodnotou 250 rpm (obr. 29). Doba trvání byla 14 dnů, přičemž bylo každý den kontrolováno a upravováno pH roztoků.



Obr. 29: Přirozená degradace v močovině (inkubátor s magnetickou míchačkou)

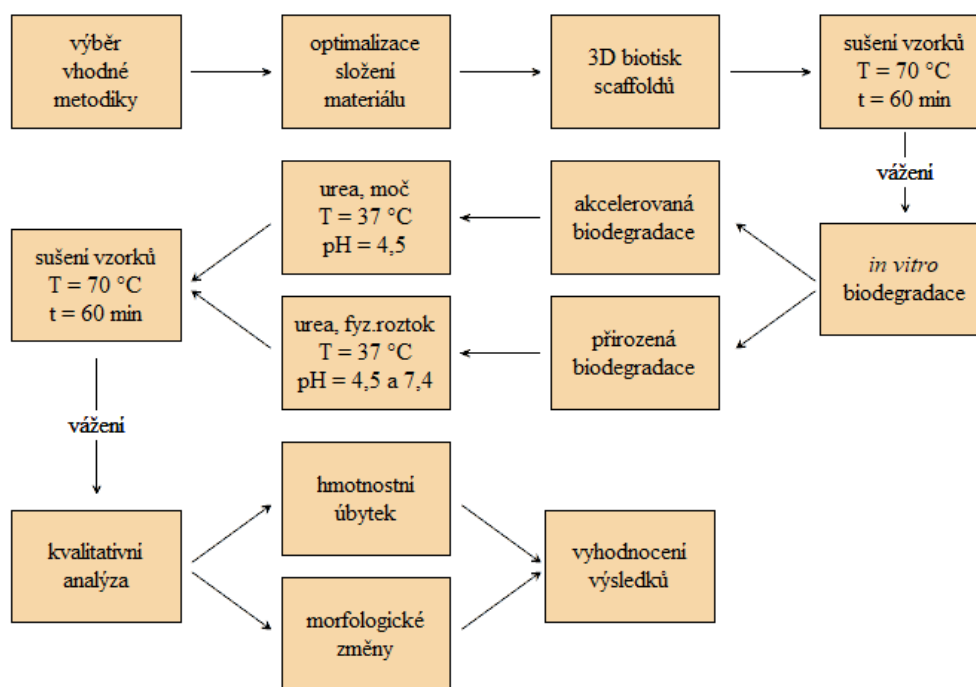
Další vzorky byly rovněž biodegradovány po dobu 16 dnů i ve fyziologickém roztoku (obr. 30) s tím, že byly v dané dny váženy. Ve fyziologickém roztoku bylo udržováno pH okolo 7,2, každý den bylo měřeno a v případě potřeby upravováno. Vždy po vytažení z roztoku byly vzorky vysušeny do konstantní hmotnosti a poté zváženy na analytické váze.



Obr. 30: Přirozená degradace ve fyziologickém roztoku (inkubátor se třepačkou)

4.1.4 Metody analýzy

Experiment byl proveden metodou kvalitativního výzkumu, tzv. *Case Study*. Tímto pojmem je možno chápat jakýkoli výzkum, jehož výsledků se nedosahuje pomocí statistických procedur nebo jinými způsoby kvantifikace; některé z údajů mohou být kvantifikovány, ale analýza je kvalitativní. U tohoto typu výzkumu je třeba kriticky analyzovat situaci, vyhnout se zkreslení a získat platné a spolehlivé údaje. Tyto metody se využívají k odhalení a porozumění podstaty jevů, které nejsou v literatuře dobře popsány nebo naopak k získání nových poznatků o již uveřejněné problematice. Dalším důvodem použití kvalitativního výzkumu je získání detailních informací, které se kvantitativními metodami obtížně podchycují. Hodnocení a porovnávání výstupů je možno realizovat s využitím různých metod jako např. hmotnostní úbytek, objemový úbytek, porozita materiálu, morfologické změny, mechanické testy zátěže, termální analýza a další (Lam a kol., 2008; Mabilieu a Sabokbar, 2008). Pro experiment bylo zvoleno porovnání hmotnostního úbytku a skenovací elektronová mikroskopie; viz diagram na obr. 31.



Obr. 31: Postupový metodický diagram

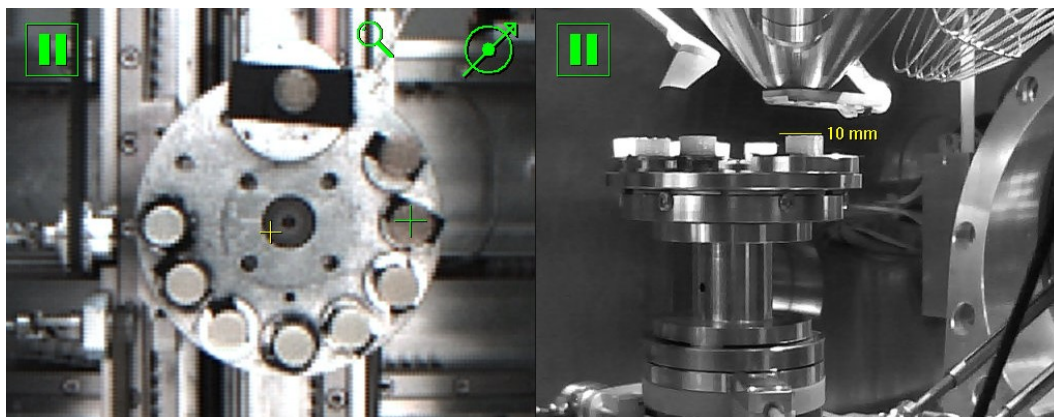
Před začátkem biodegradace byly všechny vzorky zváženy a jejich hodnoty zaznamenány. Po degradaci byly vzorky v daných časech odebrány z roztoků, promyty v destilované vodě, sušeny při 70 °C až do dosažení konstantní hmotnosti a poté opět váženy.

Procento ztráty hmotnosti způsobené biodegradací bylo vypočteno podle následující rovnice:

$$\text{hmotnostní úbytek} = \frac{w_0 - w_t}{w_0} 100 [\%],$$

kde w_0 je počáteční hmotnost vysušeného vzorku a w_t je hmotnost vysušeného vzorku v daných časech po biodegradaci. Hodnoty pH jednotlivých roztoků byly každý den měřeny a upravovány na danou hodnotu pomocí 1 % kyseliny chlorovodíkové (HCl).

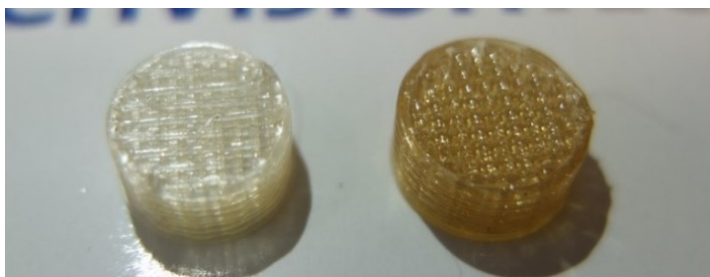
Morfologické změny vzorků před a po biodegradaci byly pozorovány pomocí skenovacího elektronového mikroskopu FEI Hp Quanta 650 FEG. Pro pozorování bylo nutné zvolit správnou techniku. Technika používající detektor sekundárně odražených elektronů (LFD) se nejevila jako vhodně zvolená, jelikož se při ní vzorek příliš nabíjel. Proto byla využita technika využívající detektor zpětně odražených elektronů (BSED), která umožňovala lepší pozorování. Mikroskop disponoval rovněž analyzátozem EDAX Genesis, který umožňoval pomocí energiově disperzní spektrometrie přesné určení chemického složení vzorku. EDAX funguje na principu vyzáření daného kvanta energie při změně energetické hladiny elektronu, ze které poté může analyzovat podíl jednotlivých prvků, a tedy složení vzorku. Pro pozorování morfologických změn pomocí SEM byly vzorky nalepeny na měděnou lepicí pásku a vloženy do komory mikroskopu, kde byl použit snížený tlak, tzv. nízké vakuum (low vakuum) a následně analyzovány z pracovní vzdálenosti 10 mm při urychlovacím napětí 10 kV, což zamezovalo nabíjení materiálu. U nevodivých biologických vzorků se materiál ve vysokém vakuu nedá pozorovat, jelikož se část elektronů obvykle přichytí na povrch, což způsobuje jeho nabíjení.



Obr. 32: Analýza vzorků pomocí SEM

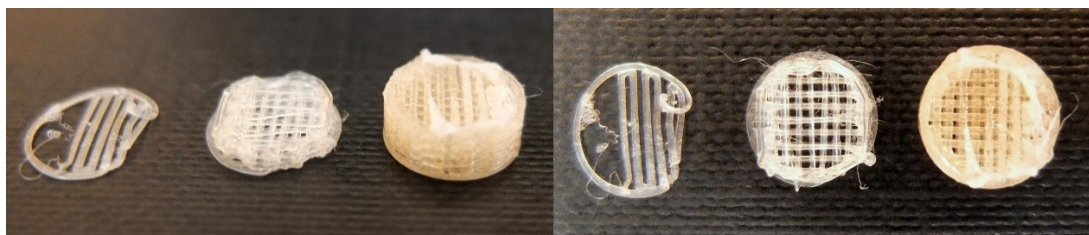
4.2 Výsledky experimentu

Testované vzorky biomateriálu vyrobené na Slovenské Technické univerzitě v Bratislavě na Fakultě chemické a potravinářské technologie byly podrobeny experimentální biodegradaci v laboratorních podmínkách. Vzorky musely být nejdříve vytištěny do formy 3D scaffoldů pomocí 3D biotiskárny a poté mohly být použity pro experiment. Již při tiskovém procesu byly zjištěny neočekávané vlastnosti a sice, že materiál degraduje už při samotném tisku v případě dlouhodobé expozice vysokým teplotám. Při teplotách nad 190 °C materiál začíná degradovat. Na obr. 33 je vidět srovnání nedegradovaného a degradovaného, tedy pro pokus nepoužitelného vzorku. Největší, lidským okem rozpoznatelný rozdíl je v barvě a velikosti jednotlivých vrstev. U degradovaného vzorku se vrstvy více rozpíjejí, jsou silnější na rozdíl od nedegradovaného vzorku, kde jsou přesné a tenké.



Obr. 33: Rozdíl mezi nedegradovaným (vlevo) a degradovaným vzorkem (vpravo)

Jelikož materiál mění v čase své vlastnosti, je třeba dbát na nastavení tiskových parametrů. Obr. 34 ilustruje výsledky chybného tisku v závislosti na špatném nastavení. Na prvním vzorku (zleva) je patrné, že materiál ještě nebyl správně zahřátý, tudíž se oddělil od platformy, která byla však příliš hladká na to, aby na ni přilnul a tisk musel být přerušen. U druhého vzorku je pozorovatelné, že na sebe nenavazují vrstvy, jelikož byla tisková rychlost příliš vysoká na to, aby k sobě jednotlivé vrstvy stihly přilnout. U třetího vzorku došlo k přerušení tisku z důvodu nedostatku materiálu v cartridge.



Obr. 34: Fotografie chybně vytištěných scaffoldů

4.2.1 Hodnocení hmotnostních změn

V průběhu procesu byly vzorky po skončení 3D tisku vysušeny a zváženy na analytických vahách, než byly umístěny do jednotlivých Erlenmeyerových baněk s různými médii. Hodnoty byly zaznamenány do tab. 9.

Tab. 9: Hmotnosti jednotlivých vzorků v g

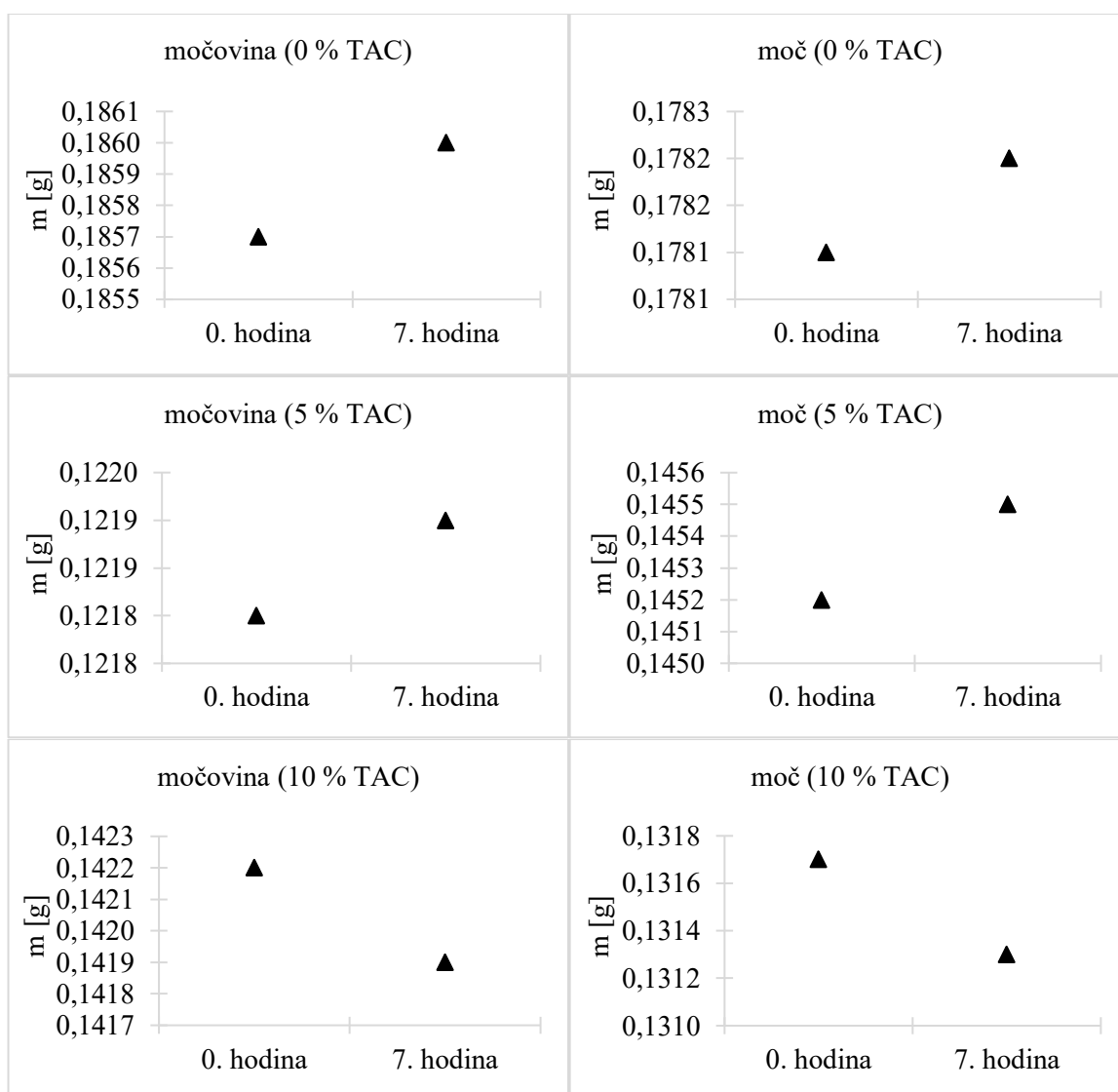
TAC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0 %	0,1288	0,1670	0,1434	0,1582	0,1589	0,1781	0,2409	0,2355	0,0922	0,1572
5 %	0,1456	0,0980	0,1437	0,1137	0,1290	0,1068	0,1228	0,1217	0,1184	0,1411
10 %	0,9660	0,1320	0,1502	0,1747	0,1559	0,1693	0,1577	0,1422	0,1313	0,1390
TAC	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
0 %	0,0989	0,1268	0,1641	0,1202	0,1853	0,0944	0,1193	0,1636	0,1969	0,2333
5 %	0,1349	0,0965	0,1263	0,1195	0,1315	0,1454	0,1712	0,1438	0,1564	0,1608
10 %	0,1369	0,1685	0,1425	0,1365	0,1492	0,1359	0,1645	0,1041	0,0946	0,1215

Akcelerovaný test degradace probíhal 7 hodin při teplotě 37 °C a navození extrémních podmínek pomocí pH 4,5, což je minimální pH, které může v močovém měchýři nastat. Vzorky byly nejprve vysušeny, zváženy na analytických vahách (tab. 10) a poté umístěny do Erlenmeyerových baněk s různými médii. V každém z médií (urea a moč) byly vždy degradovány 3 vzorky, které byly rozmístěny do baněk podle obsahu TAC, aby nedošlo k záměně a bylo možno identifikovat každou sérii zvlášť, zdali degraduje lépe či hůře.

Tab. 10: Akcelerovaná biodegradace – hmotnostní změny u vzorků degradovaných v močovíně a moči

obsah TAC médiu	0 %	5 %	10 %	0 %	5 %	10 %
	0. hodina			7. hodina		
močovina	0,0990	0,1189	0,0938	0,0993	0,1187	0,0934
	0,1857	0,1218	0,1422	0,1860	0,1219	0,1419
	0,1972	0,1592	0,1494	0,1973	0,1593	0,1492
medián	0,1857	0,1218	0,1422	0,1860	0,1219	0,1419
moč	0,1640	0,1226	0,1211	0,1643	0,1229	0,1205
	0,1781	0,1452	0,1317	0,1782	0,1455	0,1313
	0,2408	0,1555	0,1365	0,2410	0,1555	0,1362
medián	0,1781	0,1452	0,1317	0,1782	0,1455	0,1313

V grafu 1 je možné porovnat změny hmotnosti vzniklé degradací. U obsahu TAC 0 % a 5 % je zřejmé, že má graf stoupající tendenci, tedy že se hmotnost oproti počátečnímu stavu zvýšila, což mohlo být způsobeno nedostatečným vysušením vzorku. Tato chyba mohla být způsobena, ale i chybou ve vážení, kterou váha disponuje, protože se hmotnost měnila pouze v tisícinách a desetitisícinách. Nicméně při porovnání vzorků s obsahem TAC 10 % je zjevné, že zde se hmotnost snížila, tudíž je možné konstatovat, že zde proces proběhl správně. Protože bylo zjištěno, že vzorky svou hmotnost za 7 hodin téměř nezměnily, bylo dále navrženo testování dlouhodobější při stejných podmínkách. Při srovnání médií močoviny a moči je zřejmé, že močovina byla dobře namíchána, jelikož výsledky vycházejí podobně; hmotnostní úbytek činil po 7 hodinách u močoviny 0,21 % a u moči 0,3 %. Degradaci v moči mohly urychlit i ostatní látky v ní obsažené např. kyselina močová.



Graf 1: Srovnání ADT u vzorků PLA/PHB v močovně a moči

Pro výpočty byla určena míra centrální tendence pro každou sérii, tzv. medián. Při výpočtech je také nutno uvažovat nejistotu analytických vah ($1,0000 \text{ g} \pm 0,01 \text{ mg}$, tj. 0,001 %), nejistotu způsobenou nečistotou chemikálií (urea obsahuje 99,5 % čisté chemikálie, tj. 0,5 %) a nejistotu doplnění odměrné baňky (kalibrace baňky a její doplňování, tj. 0,27 %). Pro tuto práci byla tedy použita hodnota nejistoty 0,32 %, která vzešla z výpočtu celkové nejistoty N , která byla součtem všech tří složek podle vzorce:

$$N = \sqrt{(0,001^2 + 0,5^2 + 0,27^2)} = 0,322 \text{ \%}.$$

Na začátku pokusu některé ze vzorků plovaly na hladině a jiné byly zcela ponořeny. Po skončení pokusu byly však všechny vzorky zcela ponořeny na dně médií, což mohlo být způsobeno nasátím vody do struktury scaffoldů. Po zvážení bylo zjištěno, že vzorky s příměsí TAC 0 a 5 % svou hmotnost téměř nezměnily, naopak ji zvýšily, což ale mohlo být způsobeno zbytkovým obsahem vody ve vzorku. Vzorky s obsahem 10 % jako jediné svou hmotnost snížily. Za 7 hodin došlo u směsi s obsahem 10 % TAC k průměrnému hmotnostnímu úbytku o 0,3 %.

Z akcelerovaného testu nebylo tedy zcela jasné u všech vzorků, zda biodegradace probíhá nebo ne, a proto bylo přistoupeno k otestování přirozené dlouhodobé biodegradability. Jelikož může v močovém měchýři klesnout pH až na hodnotu 4,4–4,5, nebyly zjevně podmínky pro akcelerovanou degradaci natolik agresivní, aby přiměly materiál rychleji degradovat. Protože se moč se při vyšších teplotách a dlouhodobé expozici rozkládá, byla pro další testování zvolena pouze močovina o upraveném pH 4,5 a fyziologický roztok o $\text{pH } 7,2 \pm 0,2$. Obě tyto metody probíhaly současně, ačkoli na různých pracovištích s využitím různých přístrojů. Simulované proudění tělních tekutin u vzorků v močovině bylo zajištěno magnetickou míchačkou a u vzorků ve fyziologickém roztoku třepačkou. Oba experimenty trvaly 2 týdny. V průběhu pokusu byly v daných dnech vzorky vždy odebrány, omyty v destilované vodě, vysušeny při 70°C po dobu 1 hodiny a poté zváženy na analytických vahách. Hmotnosti byly vždy zaznamenány (tab. 11 a 12). Po skončení vážení byly vzorky navraceny zpět do roztoku a v experimentu se pokračovalo. Při testování biodegradability v močovině byly navíc zaznamenány větší výkyvy pH do neutrální až mírně alkalické oblasti než u testování ve fyziologickém roztoku. Na základě těchto informací lze konstatovat, že vzorky při rozpouštění uvolňují látky, které zvyšují pH.

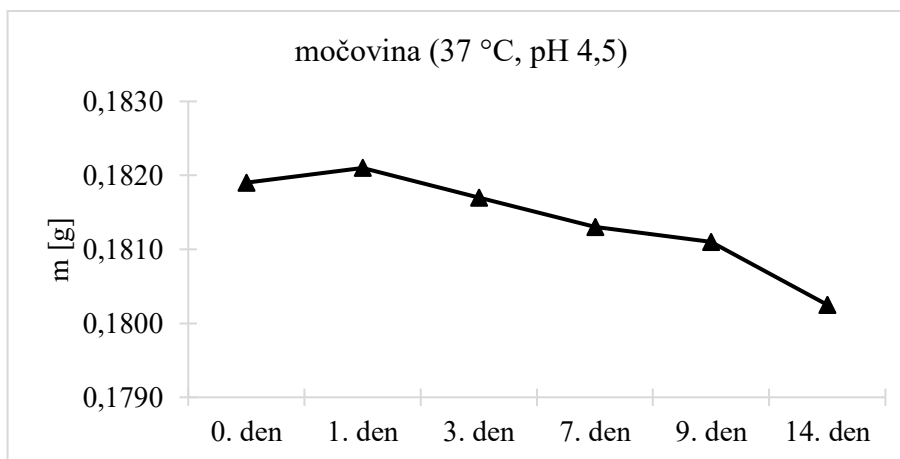
Tab. 11: Přirozená biodegradace – hmotnostní změny u vzorků degradovaných v močovině

den pokusu	0			1			3			7			9			14		
	0	5	10	0	5	10	0	5	10	0	5	10	0	5	10	0	5	10
TAC %	0,0990	0,1189	0,0938	0,0993	0,1187	0,0934	0,0960	0,1181	0,0930	0,0943	0,1176	0,0916	0,0938	0,1081	0,0928	0,0922	0,1221	0,0160
vzorek 1	0,1640	0,1218	0,1211	0,1643	0,1219	0,1205	0,1631	0,1225	0,1195	0,1626	0,1215	0,1171	0,1574	0,1094	0,1165	0,1570	0,1276	0,1143
vzorek 2	0,1781	0,1226	0,1317	0,1782	0,1229	0,1313	0,1778	0,1231	0,1307	0,1771	0,1222	0,1295	0,1769	0,1229	0,1285	0,1764	0,1276	0,1279
vzorek 3	0,1857	0,1452	0,1365	0,1860	0,1455	0,1362	0,1856	0,1426	0,1361	0,1855	0,1406	0,1338	0,1852	0,1348	0,1343	0,1841	0,1284	0,1331
vzorek 4	0,1972	0,1555	0,1422	0,1973	0,1555	0,1419	0,1972	0,1552	0,1412	0,1967	0,1545	0,1400	0,1962	0,1540	0,1395	0,1955	0,1537	0,1389
vzorek 5	0,2408	0,1592	0,1494	0,2410	0,1593	0,1492	0,2405	0,1586	0,1478	0,2402	0,1580	0,1471	0,2398	0,1572	0,1467	0,2371	0,1574	0,1460
vzorek 6	0,1819	0,1339	0,1341	0,1821	0,1342	0,1338	0,1817	0,1329	0,1334	0,1813	0,1314	0,1317	0,1811	0,1289	0,1314	0,1803	0,1280	0,1305
medián																		
hm. úbytek				-0,11%	-0,22%	0,26%	0,11%	0,78%	0,52%	0,33%	1,87%	1,83%	0,47%	3,77%	2,01%	0,91%	4,41%	2,68%

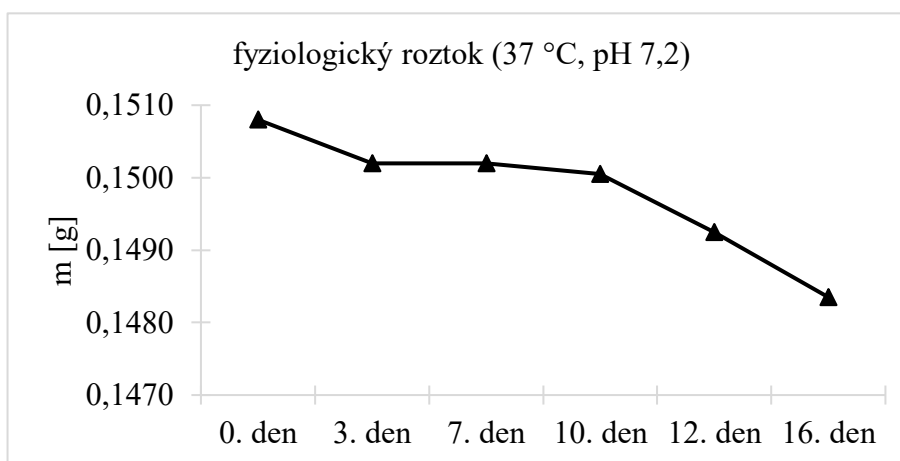
Tab. 12: Přirozená biodegradace – hmotnostní změny u vzorků degradovaných ve fyziologickém roztoku

den pokusu	0			3			7			10			12			16		
	0	5	10	0	5	10	0	5	10	0	5	10	0	5	10	0	5	10
TAC %	0,0922	0,0965	0,1041	0,0931	0,0955	0,1024	0,0914	0,0958	0,1007	0,0911	0,0951	0,1013	0,0908	0,0947	0,1008	0,0905	0,0942	0,1005
vzorek 1	0,0944	0,0980	0,1313	0,0945	0,0981	0,1334	0,0952	0,0975	0,1343	0,0942	0,0976	0,1334	0,0939	0,0971	0,1330	0,0938	0,0960	0,1326
vzorek 2	0,1202	0,1068	0,1359	0,1208	0,1067	0,1358	0,1206	0,1057	0,1351	0,1202	0,1057	0,1346	0,1201	0,1058	0,1333	0,1196	0,1049	0,1328
vzorek 3	0,1268	0,1137	0,1369	0,1266	0,1129	0,1368	0,1264	0,1121	0,1373	0,1260	0,1128	0,1368	0,1254	0,1124	0,1360	0,1254	0,1123	0,1356
vzorek 4	0,1288	0,1195	0,1390	0,1281	0,1183	0,1409	0,1292	0,1175	0,1401	0,1286	0,1175	0,1404	0,1282	0,1167	0,1397	0,1273	0,1158	0,1392
vzorek 5	0,1434	0,1290	0,1425	0,1423	0,1287	0,1451	0,1424	0,1279	0,1404	0,1425	0,1283	0,1407	0,1416	0,1270	0,1399	0,1403	0,1262	0,1395
vzorek 6	0,1582	0,1315	0,1502	0,1581	0,1294	0,1505	0,1580	0,1294	0,1490	0,1576	0,1287	0,1483	0,1569	0,1279	0,1470	0,1564	0,1275	0,1463
vzorek 7	0,1589	0,1349	0,1559	0,1585	0,1304	0,1564	0,1593	0,1295	0,1534	0,1588	0,1294	0,1533	0,1584	0,1288	0,1526	0,1575	0,1276	0,1518
vzorek 8	0,1636	0,1411	0,1577	0,1638	0,1344	0,1533	0,1626	0,1342	0,1551	0,1638	0,1342	0,1554	0,1623	0,1334	0,1543	0,1622	0,1334	0,1534
vzorek 9	0,1670	0,1437	0,1685	0,1670	0,1411	0,1678	0,1664	0,1414	0,1659	0,1658	0,1414	0,1660	0,1645	0,1407	0,1655	0,1645	0,1398	0,1646
vzorek 10	0,2333	0,1438	0,1693	0,2343	0,1422	0,1703	0,2330	0,1439	0,1670	0,2331	0,1427	0,1665	0,2320	0,1426	0,1658	0,2318	0,1417	0,1648
vzorek 11	0,2355	0,1456	0,1747	0,2359	0,1434	0,1727	0,2350	0,1442	0,1718	0,2354	0,1435	0,1717	0,2343	0,1431	0,1707	0,2334	0,1418	0,1702
vzorek 12	0,1508	0,1303	0,1464	0,1502	0,1291	0,1478	0,1502	0,1287	0,1447	0,1501	0,1285	0,1445	0,1493	0,1275	0,1435	0,1484	0,1269	0,1429
medián				0,40%	0,92%	-0,99%	0,40%	1,23%	1,13%	0,50%	1,34%	1,26%	1,03%	2,15%	1,98%	1,62%	2,61%	2,36%
hm. úbytek																		

Grafy 2 a 3 vypovídají o poklesu hmotnosti vzorků směsí PLA/PHB s obsahem 0 % TAC. Hmotnostní úbytek u vzorků degradujících v močovině činil přibližně 0,91 % a u vzorků degradujících ve fyziologickém roztoku činil 1,62 %. Při srovnání hmotnostního úbytku v močovině a ve fyziologickém roztoku je zřejmé, že ačkoli byly vzorky v močovině vystaveny kyslejšímu pH, tak vzorky degradující ve fyziologickém roztoku degradovaly z větší části, což mohlo být také způsobeno jejich nižší hmotností.



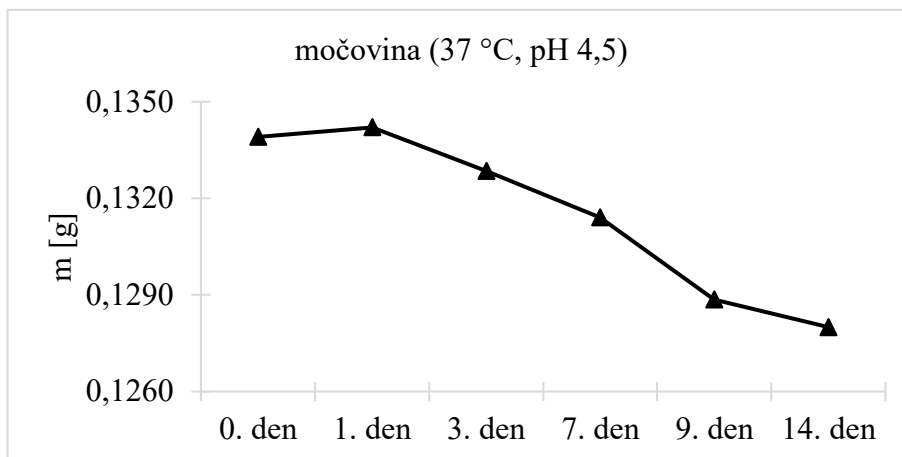
Graf 2: Hmotnostní úbytek PLA/PHB (0 % TAC) v močovině



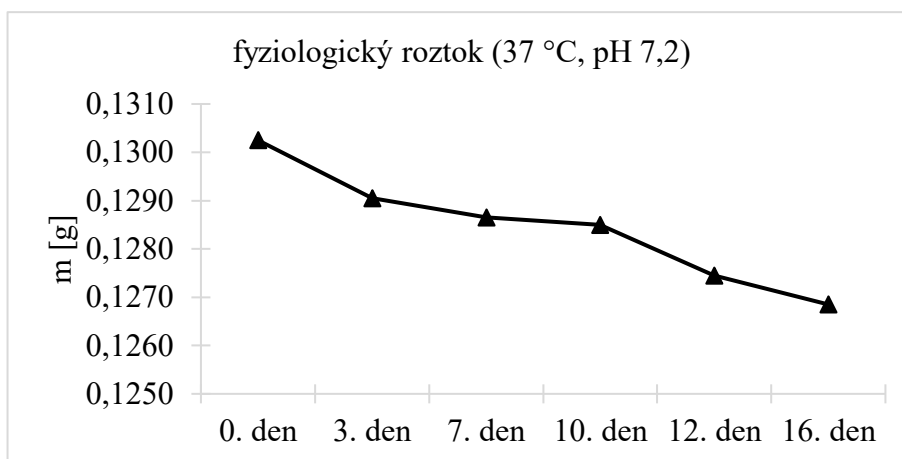
Graf 3: Hmotnostní úbytek PLA/PHB (0 % TAC) ve fyziologickém roztoku

V porovnání se směsmi s vyššími obsahy TAC degradovaly vzorky s 0 % nejpomaleji. Na základě těchto výsledků je zřejmé, že materiál s obsahem 0 % TAC sice podléhá biologickému rozkladu, ale pomaleji než vzorky s vyšším obsahem změkčovadla.

Grafy 4 a 5 ilustrují hmotnostní úbytek u směsi PLA/PHB s obsahem 5 % TAC. Hmotnostní úbytek u vzorků degradujících v močovině činil přibližně 4,41 % a u vzorků degradujících ve fyziologickém roztoku činil 2,61 %. Při porovnání těchto hodnot je zřejmé, že v tomto případě vzorky degradující v močovině při sníženém pH reagovaly na prostředí rychlejším hmotnostním úbytkem než vzorky degradující ve fyziologickém roztoku.



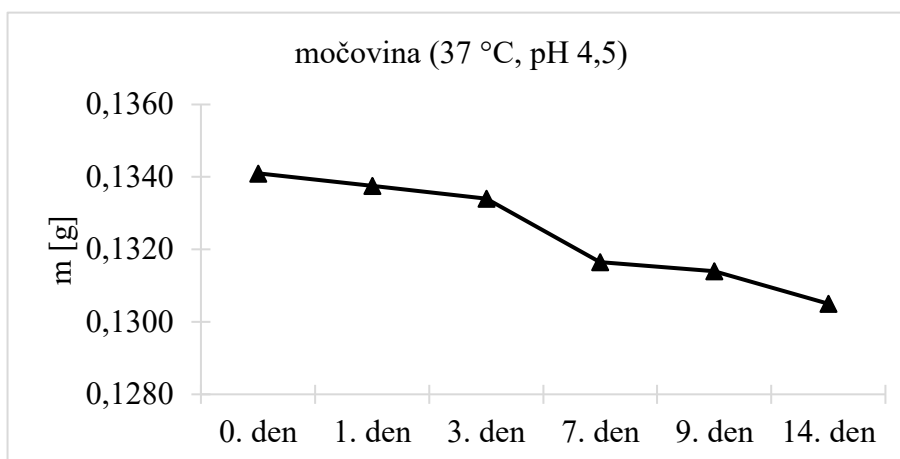
Graf 4: Hmotnostní úbytek PLA/PHB (5 % TAC) v močovině



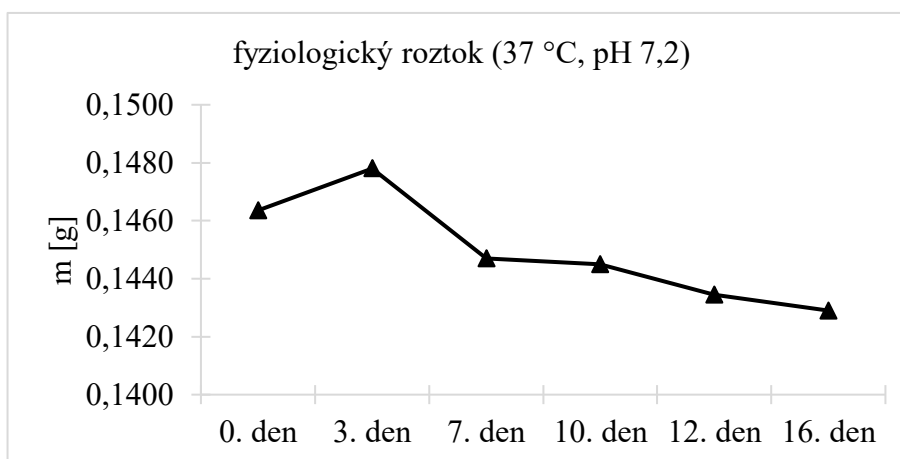
Graf 5: Hmotnostní úbytek PLA/PHB (5 % TAC) ve fyziologickém roztoku

Ve srovnání s ostatními směsmi PLA/PHB vykazovala právě tato směs s 5 % obsahem TAC v obou biodegradačních médiích největší hmotnostní úbytek během provedeného pokusu. Je zřejmé, že přítomnost daného množství změkčovadla je pro rychlost degradace velmi důležitá, protože jeho obsah nesmí být ani malý, ani příliš velký. Je tedy vždy nutné najít správný poměr všech použitých látek ve směsi.

Grafy 6 a 7 znázorňují hmotnostní úbytek u směsi PLA/PHB s obsahem 10 % TAC. Hmotnostní úbytek u vzorků degradujících v močovině činil přibližně 2,68 % a u vzorků degradujících ve fyziologickém roztoku činil 2,36 %. I na základě těchto hodnot lze usuzovat, že vzorky s 10 % TAC vystavené sníženému pH degradují o něco rychleji.



Graf 6: Hmotnostní úbytek PLA/PHB (10 % TAC) v močovině

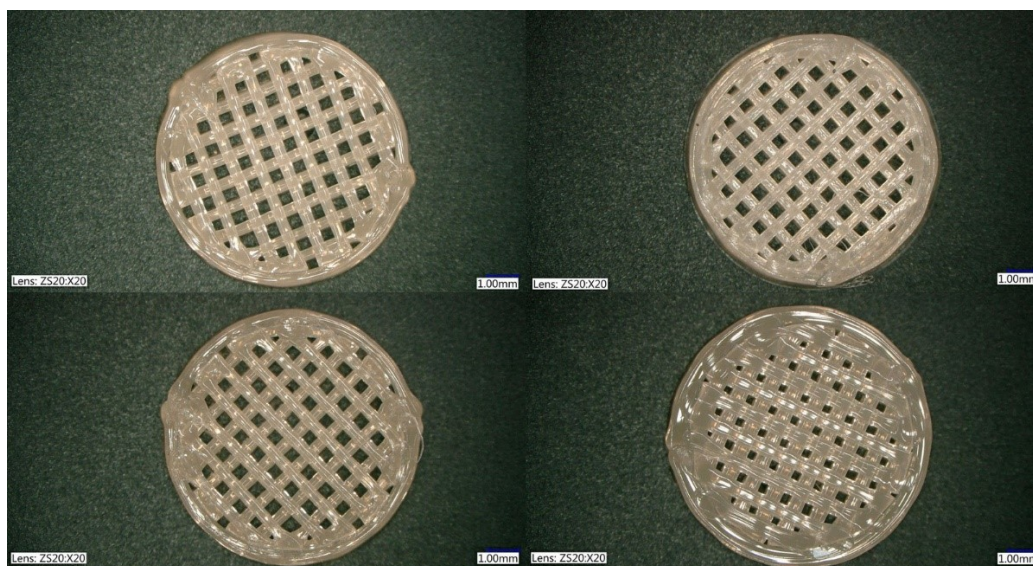


Graf 7: Hmotnostní úbytek PLA/PHB (10 % TAC) ve fyziologickém roztoku

Po dvoutýdenním testování přirozené biodegradace bylo zjištěno, že vzorky vystavené sníženému pH mají tendenci k rychlejší biodegradaci. Ačkoli testy akcelerované degradace nebyly příliš úspěšné, daly podnět ke zkoumání degradace v dlouhodobějším časovém měřítku, na základě čehož bylo dosaženo uspokojivějších výsledků. Z výsledků vyplývá, že poměr změkčovadla má vliv na rychlost degradace, čehož se dá u řízené degradace využít a podle obsahu změkčovadla nastavit čas biodegradace náhrady v organismu dle potřeby.

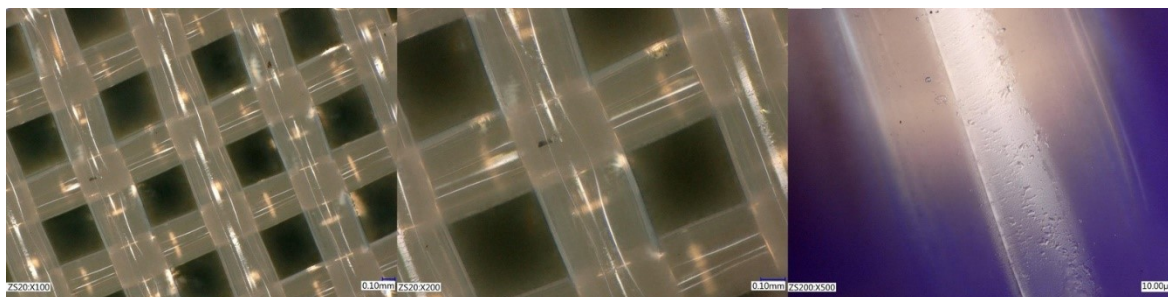
4.2.2 Analýza morfologických změn pomocí mikroskopických metod

V průběhu pokusu akcelerované degradace nebyly pozorovány žádné okem viditelné změny, a proto byly vzorky ponechány v degračních médiích až do úplného skončení pokusu. Byla pozorována pouze jedna změna – blednutí barev některých vzorů, které se dříve zdály tmavší. Tento jev byl pravděpodobně způsoben vlivem nízkého pH, kterým roztoky disponovaly. Obr. 35 a 36 byly pořízeny před začátkem biodegradace pomocí optického mikroskopu Keyence VHX-6000 na Katedře metalurgie a slévárenství. Na snímku 35 lze vidět, že není možné vytvořit při stejných podmínkách 4 naprosto identické vzorky.



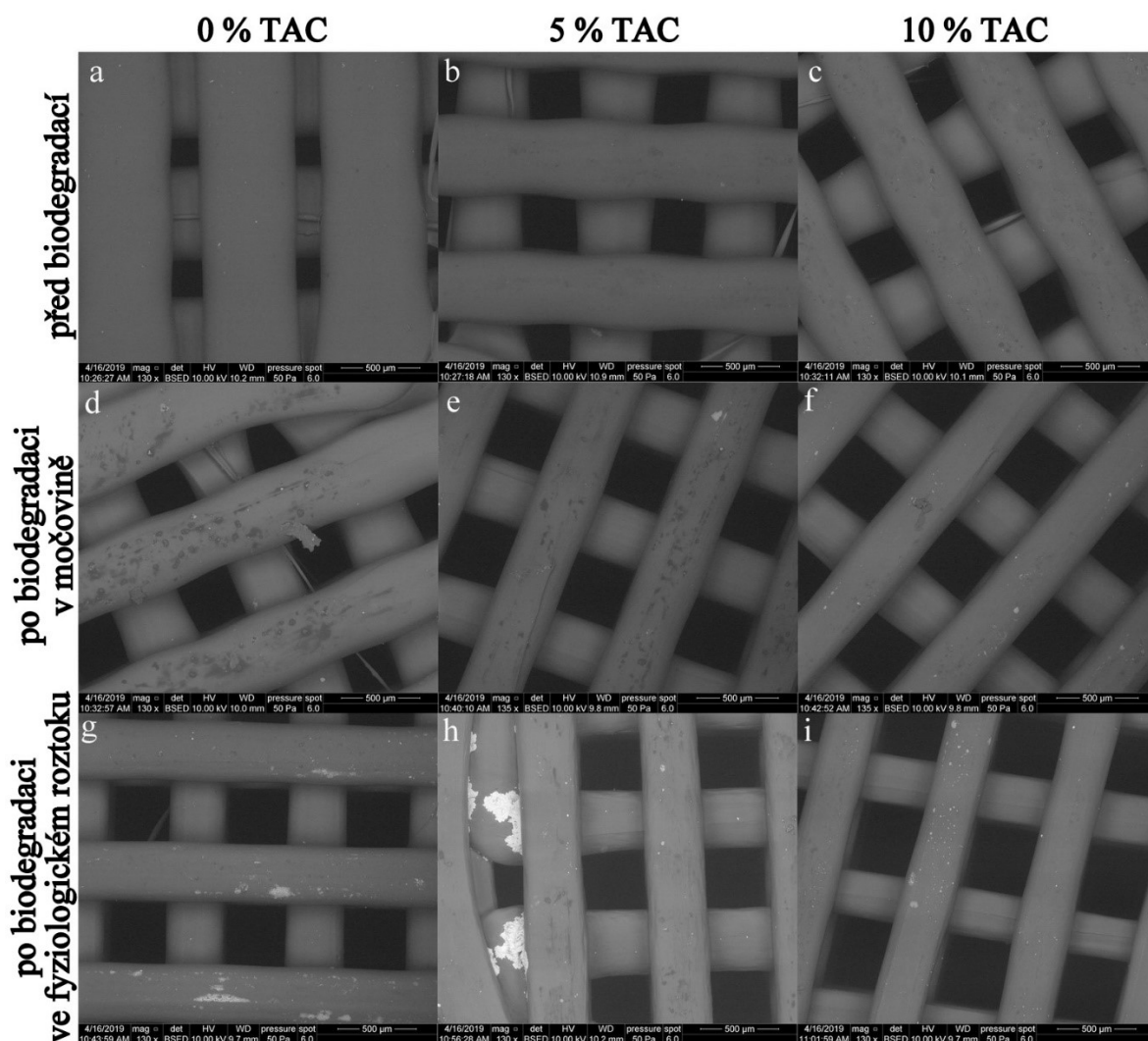
Obr. 35: Rozdíly mezi vzorky se zvětšení 20x

Na obr. 36 byly rovněž zachyceny vzorky o různém zvětšení před začátkem biodegradčního experimentu, tudíž na nich nejsou patrná žádná viditelná poškození. Pod optickým mikroskopem se vzorky jeví jako průsvitné a příliš lesklé, takže se pro další analýzu využil mikroskop elektronový, který navíc umožňuje větší zvětšení objektů.



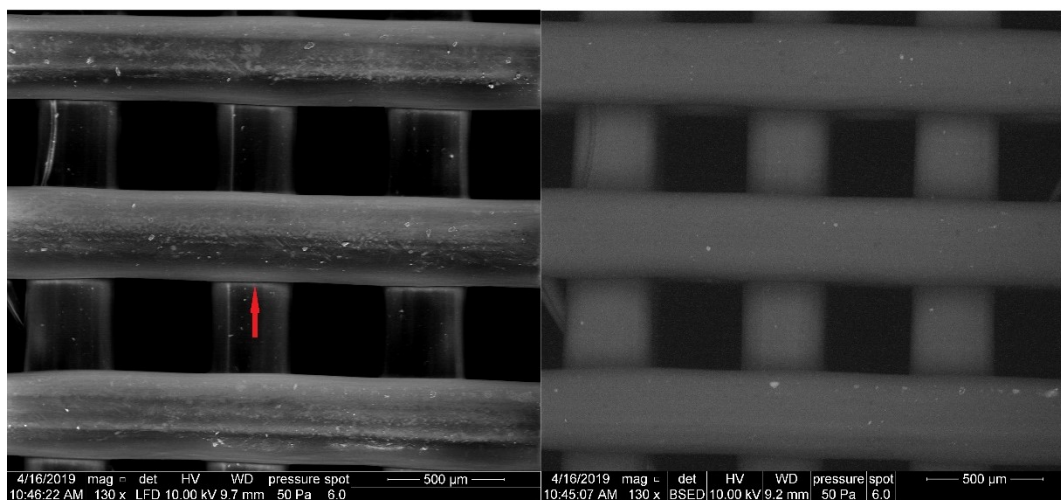
Obr. 36: Mikroskopické fotografie scaffoldů se zvětšením 100x, 200x a 500x

Na obr. 37 jsou vyfoceny vzorky pomocí SEM. Pro analýzu bylo vybráno 9 nejreprezentativnějších vzorků. Obrázky jsou seřazeny podle obsahu TAC a způsobu biodegradace. Na fotografiích pořízených před biodegradací nejsou vidět žádné viditelné stopy biodegradace, jelikož vzorky ještě nebyly podrobeny experimentu. Oproti tomu na fotografiích pořízených po biodegradaci v močovíně jsou již vidět stopy biodegradačního procesu ve formě tmavých skvrn a trhlin, kde začíná být povrch scaffoldu narušen vlivem biodegradačního média a odlupujících se částí vrstev (obr. d, f). Počínající biodegradace je taktéž pozorovatelná na povrchu vzorků degradovaných ve fyziologickém roztoku ve formě tmavých a světlých skvrn. Taktéž je zde patrný růst krystalů (obr. h), pravděpodobně NaCl (zjištěno pomocí EDAX), což svědčí o vzniku trhlin, ve kterých se tyto látky mohou snadno uchytit a následně krystalizovat.



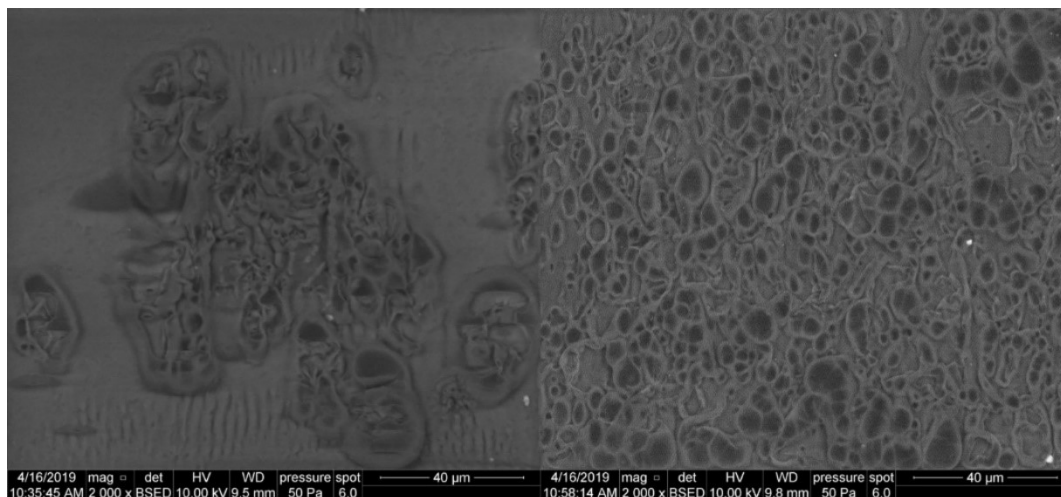
Obr. 37: Srovnání vzorků před a po biodegradaci pomocí SEM

Jelikož nebyly vzorky před pozorováním nijak upraveny např. lyofilizovány nebo naprášeny vrstvou zlata, bylo pro pozorování nutné zvolit správnou techniku, která zamezovala přílišnému nabíjení vzorku kumulujícími se elektrony (obr. 38). Technika používající detektor sekundárně odražených elektronů (LFD, vlevo) se nejevila jako vhodně zvolená, jelikož se při ní vzorek přílišně nabíjel – světlá místa vyznačená červenou šipkou. Proto byla použita technika využívající detektor zpětně odražených elektronů (BSED, vpravo), která umožňovala lepší pozorování, ačkoli s horším rozlišením.



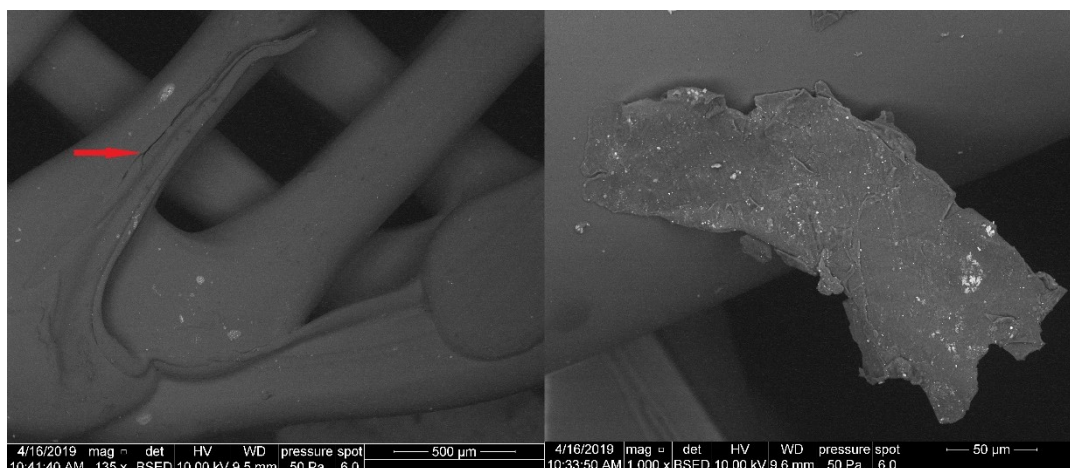
Obr. 38: Pozorování pomocí SEM v módu BSED a LFD

Při analýze na SEM byla pozorována také tepelná degradace (obr. 39), kdy materiál degradoval pod elektronovým svazkem kvůli využívání β -záření, což je však u těchto materiálu během skenování běžné. Jednotlivé dopady elektronů se jeví jako tmavé skvrny.



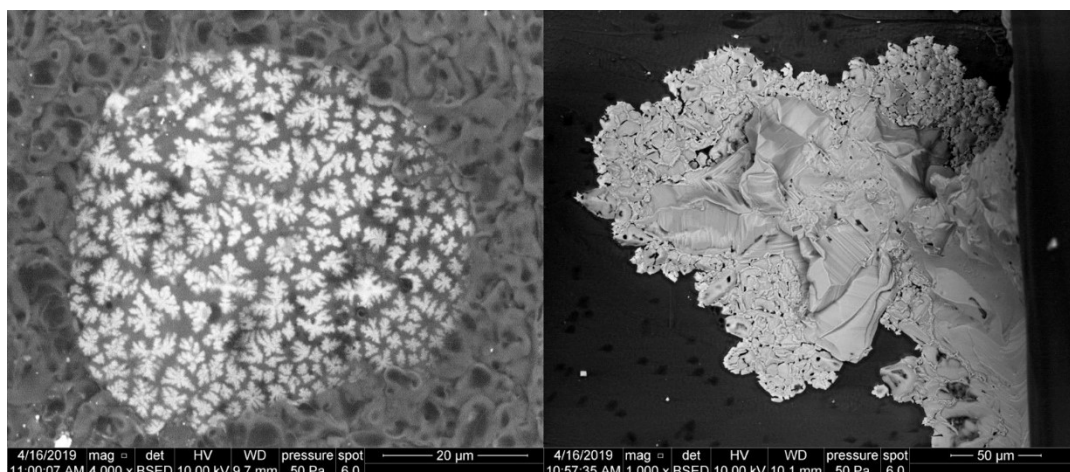
Obr. 39: Tepelná degradace PLA/PHB

U vzorků degradovaných v močovině byly patrné biodegradací projevy (obr. 40) ve formě prasklin (vyznačeno šipkou) a úlomků materiálu. Tyto projevy mohly být však způsobeny nejen degradací, ale také mechanickým poškozením z důvodu magnetického promíchávání či vzájemným otěrem vzorků mezi sebou. Vzhledem k tomu, že biodegradace scaffoldů probíhala u obou typů metod, bylo pozorováno, že velikost jednotlivých vrstev se zmenšuje, zatímco velikost pórů se zvětšuje. Poté co došlo ke ztenčení vrstev, začaly se od sebe jednotlivé vrstvy materiálu v horizontálním směru oddělovat; materiál křehnul.



Obr. 40: Projevy biodegradace

U vzorků, které byly degradovány ve fyziologickém roztoku byl pozorován i vedlejší účinek biodegradací média, viz obr. 41. Bylo zjištěno, že tento materiál umožňuje neřízený růst krystalů NaCl, což by se v budoucnu dalo využít i pro aplikace, kde je růst krystalů chtěný jako např. pro pokrytí vrstvou antibakteriálního materiálu např. stříbra.



Obr. 41: Růst krystalů NaCl

4.3 Návrh nové zkušební metodiky pro *in vitro* biodegradaci scaffoldů ze směsí PLA/PHB

Návrhu nové zkušební metodiky pro *in vitro* biodegradaci předcházelo vyhodnocení výsledků z obou experimentálně provedených biodegradací, a to na základě provedeného kvalitativního výzkumu, kterým bylo srovnání počátečních a koncových stavů vzorků z hlediska hmotnostního úbytku a morfologických změn. Jelikož byly vzorky biomateriálu testovány pro medicínské využití jako náhrady močové trubice, je potřebné co nejvíce připodobnit scaffold reálnému implantátu a biodegradační prostředí přiblížit močové soustavě lidského organismu. Protože je však močová trubice tvořena měkkou tkání, vzorky by rovněž mohly být více flexibilní, aby se co nejvíce této tkáni připodobnily. V experimentu byl na schopnost biodegradace biomateriálu testován vliv pouze jediného změkčovadla – triacetinu. Výsledky potvrdily, že procentuální obsah plastifikátoru v materiálu má vliv na jeho vlastnosti a chování. Z tohoto důvodu je na zvážení, zda nezkusit pro další testování využít i jiná změkčovadla, která by mohla mít na biodegradaci materiálu ještě lepší účinek.

Močová trubice je v průměru cca 6 – 8 mm široký trubicovitý orgán. Co se týče tvaru vzorků, výběr cylindrického scaffoldu o průměru 8 mm byl z toho úhlu pohledu naprosto ideálně zvoleným, protože umožňoval asociaci s reálnou náhradou. Pro další experimenty by bylo taktéž potřeba optimalizovat proces výroby scaffoldů, aby 3D biotiskárna tiskla vzorky se stejnou nebo hodně podobnou hmotností (v rámci setin). Je důležité zvolit vzorky podobného váhového rozmezí, protože těžší vzorek se může biodegradovat delší dobu než vzorek s nižší hmotností. Aby bylo možné srovnání změn a chování biomateriálu, bylo by vhodné otestovat při biodegradaci materiál před a po 3D tisku; degradovat např. samotný granulát. Tepelná úprava a 3D tisk může vlastnosti materiálu pozměnit.

Aby bylo možné dosáhnout přesnějších výsledků degradace, bylo navrženo testování v delším časovém měřítku a to minimálně 3 – 6 měsíců. Řízenou biodegradaci je třeba navrhnout přesně na míru testovanému biomateriálu na základě jeho vlastností jako je např. molekulová hmotnost a rozpustnost v různých médiích při různém pH. V tomto pokusu se jevila nejlepším médiem močovina kvůli její snadné přípravě a dlouhé trvanlivosti, což byl na druhou stranu problém u lidské moči, která sice sloužila pro srovnání s reálnými podmínkami, ale při dlouhodobějším vystavení vyšším teplotám se rozkládala. Mohlo by se tedy přejít na testování v reálném médiu, ale pouze za podmínek, že by bylo

každý den nově připraveno. Existují však ještě další média, která v této práci nebyla testována jako např. PBS nebo jiná vhodná biodegradační média, která se v medicínském výzkumu běžně používají. Na biodegradaci má bezpodmínečně vliv i teplota degradačních médií, což by se dalo otestovat jejím zvýšením u akcelerované biodegradace, nicméně protože se teplota lidského těla pohybuje okolo 37 °C, nejeví se její zvýšení v pokusech přirozené biodegradace jako řešení problému. Zajištění simulovaného proudění bylo také důležitým faktorem při simulaci biodegradace v podmínkách lidského organismu. Nicméně magnetická míchačka se v tomto směru nejevila jako vhodně zvolená metoda, protože pravděpodobně způsobovala mechanická poškození u některých vzorků, které se následně rozpadaly na jednotlivé vrstvy. Z tohoto pohledu by bylo příhodné zvolit méně agresivní metodu promíchávání médií jako např. třepačku.

Při měření hmotnostního úbytku jednotlivých vzorků je potřeba postupovat velmi pečlivě. Po ukončení biodegradace v daném časovém okamžiku je nezbytné vzorek vícekrát promýt v demineralizované vodě, aby se na něm neusazovaly nečistoty nebo zbytky z roztoku. Pro vysušení by bylo vhodnější zvolit vyšší teplotu, než byla použita a také delší expozici, aby byl vzorek skutečně vysušen do konstantní hmotnosti a údaje byly přesné. K tomuto problému došlo při pokusu akcelerované degradace, což se poté projevilo vyšší hmotností v konečné fázi testování. Při degradaci v médiích se tekutina a látky v ní obsažené dostávají do struktury porézního materiálu a není tak snadné se jich následným vysušením zbavit. Také bylo navrženo už jednou vysušené vzorky znovu nepoužívat, ale stále v degradaci pokračovat s těmi v médiu, neboť se vytažením vzorku z média a následným vysušením biodegradační účinky zpomalí nebo úplně zastaví. Z tohoto důvodu je potřebné, aby byl počet vzorků pro experiment vyšší, než se kterým se pracovalo v této práci.

Pro další testování je tedy rozhodně doporučeno použít alespoň 50 – 100 vzorků v závislosti na časovém intervalu, aby bylo možno postupovat metodou kvantitativního výzkumu a na základě výsledků zhotovit i statistiku, která by měla větší vypovídající hodnotu o daném experimentu a také vyšší signifikantnost výsledků. Při úspěšném dlouhodobém testování *in vitro* by přicházelo na řadu testování *in vivo* s využitím vhodného modelového zvířecího organismu. Výzkum by byl však náročnější z hlediska času i financí.

5 DISKUSE

V této práci bylo poměrně problematické diskutovat výsledky s jinými autory, jelikož existuje jen velmi málo vědců, kteří provedli biodegradaci stejné směsi, stejnou metodou a uveřejnili výsledky. Mnoho autorů však již testovalo biodegradabilitu jednotlivých složek samostatně, kde se zabývali hlavně pevnostními vlastnostmi uvedených polymerů. S testováním polymerních biomateriálů začal již v roce 1995 Lianlai Zhang a kol. (Zhang a kol., 1995), který ve své práci studoval mísitelnost různých polymerních směsí, mezi nimi i směs PLA/PHB, a jejich vlastnosti narušené hydrolytickou degradací. Ve studii bylo potvrzeno, že daný materiál by v budoucnu mohl být použit díky svým biodegradabilním vlastnostem pro medicínské aplikace, což koresponduje s dosaženými výsledky, tedy, že se materiál ve vodném prostředí skutečně rozkládá. Biodegradaci *in vitro* PLLA a PHB v pufovaném roztoku a roztoku pankreatinu (trávicí enzym) extrahovaného z potkanů zkoumali i Freier a kol. (Freier a kol., 2002). Po jednom roce v pufovaném roztoku (37 °C, pH 7,4,) se molekulová hmotnost čistého PHB snížila o polovinu a u PLLA o třetinu. V tomto pokusu bylo pozorováno zpomalení rychlosti degradace přidáním hydrofobních změkčovadel – triethyl citrát (TEC) a butyryl trihexyl citrát (BTHC). V experimentu této práce však bylo dosaženo nejlepších výsledků a největšího úbytku hmotnosti právě u směsi s nejvyšším obsahem změkčovadla TAC. Lze tedy konstatovat, že některé druhy změkčovadel mohou mít na rychlost biodegradace zásadní vliv. Testy *in vitro* ve studii Freier a kol. prokázaly akcelerační účinek pankreatinu na degradaci PHB, která byla trojnásobně urychlena. Na základě výsledků je možné konstatovat, že ačkoli PHB materiál zprvu odolává nízkému pH po dostatečně dlouhou dobu, nakonec je schopen se v organismu úplně rozložit.

Scaffoldy s obsahem PLA a PHB prokazují rovněž slibný potenciál při osazení zvířecími buňkami, a proto jsou značně studovanými biomateriály pro svůj potenciál biodegradovat. V práci Li a kol. (Li a kol., 2008) byly testovány různé kopolymery PHB metodou akcelerované degradace v SBF při 37 °C. Bylo zjištěno, že kopolymer poly(3-hydroxybutyrát-ko-3-hydroxyhexanoát)maleát po 21 týdnech v roztoku ztratil 21,4 % své původní hmotnosti. V jiné studii od Boskhomdzhev a kol. (Boskhomdzhev a kol., 2010), která byla zaměřena rovněž na biodegradaci PHB, byla studována rychlost *in vitro* biodegradace v přítomnosti lipázy a *in vivo* po implantaci do zvířecí tkáně. Bylo v ní prokázáno, že biodegradace PHB zahrnuje jak polymerovou hydrolýzu, tak její

enzymatickou degradaci. Studium kinetiky enzymatické degradace PHB *in vitro* je důležité pro pochopení mechanismů odpovědných za degradaci PHB ve zvířecích tkáních.

V práci Guo a kol. (Guo a kol., 2017) byly zkoumány možnosti charakterizace biologicky rozložitelných porézních scaffoldů z PLA připravených pro využití ve tkáňovém inženýrství pomocí selektivní enzymatické degradace. Porézní morfologie a vlastnosti scaffoldů zde byly zkoumány za účelem objasnění, zda je mikrostruktura biomimetické extracelulární matrice vhodná pro buněčnou proliferaci a diferenciaci. Výsledky ukázaly, že PLA scaffoldy byly zcela degradovány na neškodné produkty v roztoku simulované tělesné tekutiny při pomalé rychlosti degradace. Ztráta hmotnosti dosáhla po 8 měsících *in vitro* biodegradace 80 %. Výsledky navíc ukázaly, že PLA scaffoldy podporují propojení a růst buněk, konkrétně embryonálních fibroblastů myši (MEF), což prokazuje, že selektivní enzymatická degradace má potenciální uplatnění při výrobě scaffoldu.

Polymery PLA a PHB jsou taktéž často studijním objektem prací zaměřujících se na biodegradaci v kompostovacích podmínkách. Studie Navarro-Baena a kol. (Navarro-Baena a kol., 2016) se zaměřovala na návrh biodegradabilních směsí na bázi polymléčné kyseliny a polykaprolaktonu (PCL). Byly v ní zkoumány nejen vlastnosti a chování směsí v různých koncentracích, ale také dva různé způsoby biodegradace. Prvním experimentem byla 20týdenní *in vitro* biodegradace za hydrolytických podmínek s použitím fosfátového pufrového roztoku (PBS) při 37 °C a s pH 7,2 – 7,4. Druhým byla 4týdenní biodegradace v kompostovacích podmínkách při 58 °C. U *in vitro* degradace směsí obsahující PLA:PCL v poměru 100:0 a 70:30 nebyl zjištěn ani po 20 týdnech žádný hmotnostní úbytek. Oproti tomu ve směsích obsahujících PLA:PCL v poměrech 0:100, 30:70 a 50:50 činil hmotnostní úbytek 3% hmotnosti. U přirozené degradace v kompostu nebyl po čtyřech týdnech zjištěn žádný zbytek materiálu, tedy že směs se 100 % podílem PLA byla zcela degradována. Lze tedy konstatovat, že při *in vitro* testech degradují biomateriály pomaleji než při degradaci za kompostovacích podmínek, kde je zvýšená teplota. V této práci bylo zjištěno, že poměr jednotlivých látek ve směsi a jejich zpracování dost pravděpodobně ovlivňuje vlastnosti biomateriálu a také jeho schopnost biodegradability.

Nejaktuálnější studie zabývající se biodegradací biomateriálů v močových cestách je práce Sébastien Champagne z ledna roku 2019 (Champagne a kol., 2019). V této práci bylo studováno *in vitro* degradační chování vstřebatelných slitin zinku a hořčíku v umělé moči

pomocí elektrochemických metod. Experimentální část této práce zkoumá, zdali mají absorbovatelné kovy potenciál pro výrobu tuhých dočasných stentů pro léčbu močových cest. Na základě zrychleného testu degradace bylo zjištěno, že hořčík vykazuje vyšší rychlost koroze než zinek. Práce dochází k závěru, že slitiny zinku jsou pro stentové aplikace močové trubice vhodnější, protože kontinuální rozpouštění kovu v moči brání přilnutí bakterií na povrch implantátu a působí jako prevence proti kalcifikaci stentu. U scaffoldů testovaných v této práci byl prokázán růst krystalů NaCl na jejich povrchu, čehož by se dalo využít. Pokud by na povrch vzorku byla nafixována tenká vrstva zinku nebo stříbra, mohl by scaffold nabýt zároveň antibakteriálních vlastností.

Biomateriály z PLA a PHB bývají často podrobovány experimentům za účelem zjištění možnosti využití v obalových technologiích potravin a následné schopnosti biodegradability v kompostovacích podmínkách. Biodegradaci a fyzikální hodnocení obalů z PHB ve své práci zmiňuje i Bucci a kol. (Bucci a kol., 2007). Vlastnosti obalů byly hodnoceny pomocí fyzikálních zkoušek v porovnání s obaly z polypropyleny (PP). Výsledky ukázaly, že obaly fungovaly jako účinná bariéra proti světlu a vlhkosti. Biologická degradace byla účinná už po 60 dnech v kompostu, kde byly obaly téměř rozloženy.

Savenkova a kol. (Savenkova a kol., 2000) ve své studii zkoumala vliv plastifikátorů na fyzikální a biodegradaci vlastnosti filmů na bázi PHB. Pro laboratorní pokus bylo zvoleno akcelerované degradační testování (ADT), které bylo prováděno při teplotě 25 °C v mikrobiálně aktivních půdních vrstvách. Vzorky filmu na bázi PHB byly ponechány v půdě po dobu 30 dnů, než se rozložily. Bylo zjištěno, že mezi půdní bakterie, které dokáží efektivně degradovat tento biomateriál patří rody *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Streptomyces*. Závěrem této práce bylo, že se zvyšující se koncentrací plastifikátorů se úměrně snižuje rychlost biodegradace, což však nekoresponduje s výsledky v této práci. Jelikož však ale biodegradace ve studii od Savenkova a kol. probíhala v kompostu, je možné, že přítomnost plastifikátorů má negativní dopad na přítomná bakteriální konsorcia.

S podobným nápadem experimentovala ve své práci Wisuda Pattanasuttichonlakul a kol. (Pattanasuttichonlakul a kol., 2018) z Thajské Mahidol University. Cílem bylo vyvinout účinnou metodu pro urychlení degradace nápojových obalů na bázi kyseliny polymléčné. V práci byla zkoumána akcelerovaná biologická degradace PLA pomocí ozáření ultrafialovým světlem typu C (UVC) a následným umístěním do půdy obsahující

mikrobiální konsorcia z kalu odpadní vody. Bylo zjištěno, že PLA prokazuje velmi dobré biodegradační vlastnosti, protože se po 15 dnech degradace v půdě úplně rozložila. Dominantní bakterie v půdní směsi byly *Actinomadura sp.* a *Pseudomonas geniculata*. Jelikož materiál dobře degraduje v kompostu, kde jsou přítomny bakterie, na rychlost biodegradace by tedy mohla mít vliv i přítomnost bakterií, které se při močových obstrukcích vyskytují v močových cestách jako je např. *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* nebo *Klebsiella pneumoniae*, což by mohlo být předmětem zkoumání i v nadcházejících studiích, kde se tento materiál bude testovat.

Podobnou studii publikoval Abdelwahab a kol. (Abdelwahab a kol., 2012), který došel k závěru, že plastifikátory zvané lapoly ovlivňují vnitřní struktury směsí. Přidání plastifikátoru způsobuje zvýšení poměrného prodloužení při namáhání v tahu. V této studii bylo zjištěno, že po přidání plastifikátoru Lapol® 108 biodegradovaly vzorky obsahující PHB rychleji než vzorky obsahující PLA. Rozpad plastifikované směsi PLA/PHB určené pro balení potravin za kompostovacích podmínek studovali rovněž Arrieta a kol. (Arrieta a kol., 2014b). Pro tento pokus byly připraveny fólie z čisté PLA, plastifikované PLA a PLA/PHB, které byly zpracovány metodou meltblendingu (smísení taveniny extrudérem nad teplotou skelného přechodu a teploty tání) a byly dále zpracovávány za kompostovacích podmínek při 58°C. Práce dokázala, že směs PLA/PHB byla během jednoho měsíce úspěšně biodegradována. Z poznatků této práce lze usuzovat, že rovněž metoda, jakou se polymer pro experiment připraví, v tomto případě 3D tisk, má také vliv na rychlost biodegradace.

Směs PLA/PHB byla rovněž studována pro svoji schopnost biodegradovat ve vodném termofilním anaerobním prostředí s využitím čistírenských kalů. Dvořáčková a kol. (Dvořáčková a kol., 2017) testovali biodegradaci směsné fólie z PLA/PHB v mezofilním a termofilním anaerobním kalu. Tato studie potvrdila, že se PLA za mezofilních podmínek nerozkládá, zatímco v termofilním prostředí biodegraduje z více jak 80 %. Během abiotické hydrolýzy směsi PLA/PHB bylo za 60 dnů dosaženo rozkladu 23,8 %, což prokazuje, že hydrolytické enzymy přítomné v termofilním anaerobním kalu mají vliv na stupeň biodegradace. Relativně nízká teplota 37 °C může být tedy důvodem proč materiál degradoval pomaleji, než bylo očekáváno. Všichni uvedení autoři dochází k podobným výsledkům, a sice že biomateriál na bázi PLA/PHB by jednou mohl být díky svým biodegradabilním vlastnostem použit pro vývoj různých zdravotnických prostředků nebo obalových materiálů pro potraviny.

6 ZÁVĚR

Nedostatečný počet dárců orgánů a zvyšující se počet pacientů čekajících na transplantaci je v posledních letech ve zdravotnictví velkým problémem. Jelikož transplantovaný orgán není možné recipientovi upravit na míru, biologická odezva, kterou organismus vytvoří jako reakci na cizorodou látku, může mít pro život pacienta fatální důsledky. Díky modernizaci a pokroku ve vědě byl urychlen také vývoj nových odbouratelných polymerních biomateriálů, které je možno zpracovat a upravit na míru technologií 3D biotisku. Testování biomateriálů, které mají být potenciálně využity pro implantační účely je prvním a zásadním krokem k jejich úspěšnému využití jako náhrad tvrdých či měkkých tkání.

Akcelerovaná a přirozená biodegradace *in vitro* jsou dvě efektivní metody, jak otestovat vhodnost materiálu pro použití v lidském organismu. Pro toto testování byla zvolena směs PLA/PHB pro své jedinečné bioresorbovatelné a biodegradabilní vlastnosti. Práce byla realizována metodou kvalitativního výzkumu a výsledky byly hodnoceny pomocí hmotnostního úbytku a morfologických změn. Pro experiment byly využity 3 směsi PLA/PHB s různým obsahem změkčovadla triacetin v poměru 0 %, 5 % a 10 %. V experimentu bylo zjištěno, že zvolený materiál degraduje v *in vitro* podmínkách pozvolně, a je tedy vhodným biomateriálem pro další zkoumání. Jako nejvhodnější se jevila směs s 5 % obsahem změkčovadla, u které činil hmotnostní úbytek během dvou týdnů v močovině $4,41 \pm 0,32$ %, což převedeno do dlouhodobějšího měřítka znamená, že by měl být implantát v lidském těle rozložitelný za necelý rok. V práci byl rovněž vypracován návrh nové metodiky, jak postupovat při dalším testování této směsi.

Aby bylo možno materiál použít jako náhradu tkáně pacienta, je třeba jej ještě otestovat s využitím animálních testů *in vivo*, případně zajistit optimalizaci výrobního procesu pomocí výběru nejvhodnějších poměrů látek ve směsi tak, aby se implantát močové trubice řízeně biodegradoval po splnění svého účelu. Tato studie by měla sloužit jako podkladový materiál pro nadcházející výzkumy a případné publikace. Biodegradovatelnost biomateriálu ze směsí PLA/PHB pro jeho použití v medicínských aplikacích nebyla dosud testována mnoha institucemi, avšak výsledky získané v experimentální části této práce vykazují velký potenciál tohoto materiálu pro využití ve tkáňovém inženýrství jako náhrady pro léčbu uretritidy.

7 LITERATURA A ZDROJE

- [1] ABDELWAHAB, M. A., A. FLYNN, B.-S. CHIOU, S. IMAM, W. ORTS a E. CHIELLINI. Thermal, mechanical and morphological characterization of plasticized PLA–PHB blends. *Polymer Degradation and Stability*. 2012, roč. 97, č. 9, s. 1822-1828. ISSN 0141-3910. DOI: 10.1016/j.polyimdegradstab.2012.05.036
- [2] AGRAWAL, C. M. Reconstructing the human body using biomaterials. *JOM – The Journal of The Minerals, Metals & Materials Society*. 1998, roč. 50, č. 1, s. 31-35. ISSN 1543-1851
- [3] AGRAWAL, C. M., J. L. ONG, M. R. APPLEFORD a G. MANI. *Introduction to Biomaterials: Basic Theory with Engineering Applications*. New York: Cambridge University Press, 2014. ISBN 978-0-521-11690-9
- [4] ANDERSON, J. M., A. RODRIGUEZ a D. T. CHANG. Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in Immunology*. 2008, roč. 20, č. 2, s. 86-100. ISSN 1044-5323. DOI: 10.1016/j.smim.2007.11.004
- [5] ARRIETA, M. P., J. LÓPEZ, A. HERNÁNDEZ a E. RAYÓN. Ternary PLA–PHB–limonene blends intended for biodegradable food packaging applications. *European Polymer Journal*. 2014a, roč. 50, s. 255-270. ISSN 00143057. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2013.11.009
- [6] ARRIETA, M. P., J. LÓPEZ, E. RAYÓN a A. JIMÉNEZ. Disintegrability under composting conditions of plasticized PLA–PHB blends. *Polymer Degradation and Stability*. 2014b, roč. 108, s. 307-318. ISSN 0141-3910. DOI: 10.1016/j.polyimdegradstab.2014.01.034
- [7] BABENSEE, J. E., J. M. ANDERSON, L. V. MCINTIRE a A. G. MIKOS. Host response to tissue engineered devices. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1998, roč. 33, č. 1, s. 111-139. ISSN 0169-409X. DOI: 10.1016/S0169-409X(98)00023-4
- [8] BADYLAK, S. F. a T. W. GILBERT. Immune response to biologic scaffold materials. *Seminars in Immunology*. 2008, roč. 20, č. 2, s. 109-116. ISSN 1044-5323. DOI: 10.1016/j.smim.2007.11.003
- [9] BALAKRISHNAN, P., M. S. SREEKALA a T. SABU. *Fundamental Biomaterials: Metals*. Woodhead Publishing: Elsevier, 2018. 438 s. ISBN 9780081022054. DOI: 10.1016/c2016-0-03502-7

- [10] BARBECK, M., T. SERRA, P. BOOMS, S. STOJANOVIC, S. NAJMAN, E. ENGEL, R. SADER, CH. J. KIRKPATRICK, M. NAVARRO a S. GHANAATI. Analysis of the in vitro degradation and the in vivo tissue response to bi-layered 3D-printed scaffolds combining PLA and biphasic PLA/bioglass components – Guidance of the inflammatory response as basis for osteochondral regeneration. *Bioactive Materials*. 2017, roč. 2, č. 4, s. 208-223. ISSN 2452-199X. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2017.06.001
- [11] BARNATT, CH. *3D Printing: Third edition*. CreateSpace Independent Publishing Platform, 2016. 318 s. ISBN 978-1539655466
- [12] BARTONÍČEK, J. Early history of operative treatment of fractures. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*. 2010, roč. 130, č. 11, s. 1385-1396. ISSN 0936-8051. DOI: 10.1007/s00402-010-1082-7
- [13] BERTEANU, E, D IONITA, M SIMOIU, M PARASCHIV, R TATIA, A APATEAN, M SIDOROFF a L TCACENCO. Evaluation of biodegradation and biocompatibility of collagen/chitosan/alkaline phosphatase biopolymeric membranes. *Bulletin of Materials Science*. 2016, roč. 39, č. 2, s. 377-383. ISSN 0250-4707. DOI: 10.1007/s12034-016-1161-7
- [14] BONO, M.J. a W.C. REYGAERT. Urinary tract infection. *StatPearls*. 2019. PMID: 29261874
- [15] BOSKHOMDZHIEV, A. P., A. P. BONARTSEV, T. K. MAKHINA, V. L. MYSHKINA, E. A. IVANOV, D. V. BAGROV, E. V. FILATOVA, A. L. IORDANSKII a G. A. BONARTSEVA. Biodegradation kinetics of poly(3-hydroxybutyrate)-based biopolymer systems. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2010, roč. 4, č. 2, s. 177-183. ISSN 1990-7508. DOI: 10.1134/S1990750810020083
- [16] BROWN, B. N., J. E. VALENTIN, A. M. STEWART-AKERS, G. P. MCCABE a S. F. BADYLAK. Macrophage phenotype and remodelling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component. *Biomaterials*. 2009, roč. 30, č. 8, s. 1482-1491. ISSN 0142-9612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.11.040
- [17] BUCCI, D. Z., L. B. B. TAVARES a I. SELL. Biodegradation and physical evaluation of PHB packaging. *Polymer Testing*. 2007, roč. 26, č. 7, s. 908-915. ISSN 0142-9418. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2007.06.013

- [18] CERAROOT. Metal-free Zirconia Dental Implants. *CeraRoot*. 2018. Dostupné z: <https://www.ceraroot.com/patients/10-reasons-why/>
- [19] CHAMPAGNE, S., E. MOSTAED, F. SAFIZADEH, E. GHALI, M. VEDANI a H. HERMAWAN. In vitro degradation of absorbable zinc alloys in artificial urine. *Materials*. 2019, roč. 12, č. 2. ISSN 1996-1944. DOI: 10.3390/ma12020295.
- [20] CHAMUAH, N., A. SAIKIA, A. M. JOSEPH a P. NATH. Blu-ray DVD as SERS substrate for reliable detection of albumin, creatinine and urea in urine. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2019, roč. 285, s. 108-115. ISSN 0925-4005. DOI: 10.1016/j.snb.2019.01.031
- [21] CHAN, G. a D. J. MOONEY. New materials for tissue engineering: towards greater control over the biological response. *Trends in Biotechnology*. 2008, roč. 26, č. 7, s. 382-392. ISSN 0167-7799. DOI: 10.1016/j.tibtech.2008.03.011
- [22] CHEN, F. M. a X. LIU. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Progress in Polymer Science*. 2016, roč. 53, s. 86-168. ISSN 0079-6700. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004
- [23] CHEN, Q. Z., S. E. HARDING, N. N. ALI, A. R. LYON a A. R. BOCCACCINI. Biomaterials in cardiac tissue engineering: Ten years of research survey. *Materials Science and Engineering: R: Reports*. 2008, roč. 59, č. 1-6, s. 1-37. ISSN 0927-796X. DOI: 10.1016/j.mser.2007.08.001
- [24] CHEN, Q., S. LIANG a G. A. THOUAS. Elastomeric biomaterials for tissue engineering. *Progress in Polymer Science*. 2013, roč. 38, č. 3-4, s. 584-671. ISSN 0079-6700. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2012.05.003
- [25] CHIRILA, T. a D. G. HARKIN. *Biomaterials and Regenerative Medicine in Ophthalmology*. Second edition. Boston: Elsevier/Woodhead Publishing, 2016. ISBN 978-0-08-100184-4
- [26] CHOI, J., O-CH. KWON, W. JO, H. J. LEE a M.-W. MOON. 4D printing technology: A review. *3D Printing and Additive Manufacturing*. 2015, roč. 2, č. 4, s. 159-167. ISSN 2329-7662. DOI: 10.1089/3dp.2015.0039
- [27] CHU, CH. CH., J. A. VON FRAUNHOFER a H. P. GREISLER. *Wound Closure Biomaterials and Devices*. CRC Press, 2018, 416 s. ISBN 9780203733653
- [28] DAS, D., Z. ZHANG, T. WINKLER, M. MOUR, C. I. GÜNTHER, M. M. MORLOCK, H.-G. MACHENS a A. F. SCHILLING. Bioresorption and degradation

- of biomaterials. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 2012, roč. 126, s. 317-333. ISSN 0724-6145. DOI: 10.1007/10_2011_119
- [29] DAVIS, J. R. *Handbook of materials for medical devices*. Materials Park, OH: ASM International, 2003. ISBN 087170790x. DOI: 10.1361/hmmd2003p001
- [30] DEMIRBAS, A., H. SARICI, M. F. KILINC, O. TELLI, B. C. OZGUR, O. G. DOLUOGLU a S. BOZKURT. The relationship between acidic urinary pH and overactive bladder; alkalization of urine improves the symptoms of overactive bladder. *Urologia Internationalis*. 2015, roč. 95, č. 2, s. 223-226. ISSN 0042-1138. DOI: 10.1159/000375322
- [31] DODSON, B. L. a H. L. SCHWAB. *Accelerated Testing: A Practitioner's Guide to Accelerated and Reliability Testing*. Sae International, 2003. 268 s. ISBN 978-0-7680-8042-1
- [32] DVOŘÁČKOVÁ, M., M. BARTUNKOVÁ, M. KOUTNÝ a L. VANHAROVÁ. Biodegradace směsí PLA/PHB ve vodném termofilním anaerobním prostředí. *Waste Forum*. 2017, roč. 3, s. 209-217. ISSN 1804-0195
- [33] ELIAZ, N. *Degradation of Implant Materials*. New York: Springer New York, 2012. ISBN 978-1-4614-3941-7. DOI: 10.1007/978-1-4614-3942-4
- [34] FINCH, J. Oldest prosthetic helped Egyptian mummy to walk. *BBC*. Egyptian Museum, Cairo, 2012. Dostupné z: <https://www.bbc.com/news/education-19802539>
- [35] FINDRIK BALOGOVÁ, A., R. HUDÁK, T. TÓTH, M. SCHNITZER, J. FERANC, D. BAKOŠ a J. ŽIVČÁK. Determination of geometrical and viscoelastic properties of PLA/PHB samples made by additive manufacturing for urethral substitution. *Journal of Biotechnology*. 2018, roč. 284, s. 123-130. ISSN 0168-1656. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2018.08.019
- [36] FONSECA, K. B., P. L. GRANJA a C. C. BARRIAS. Engineering proteolytically-degradable artificial extracellular matrices. *Progress in Polymer Science*. 2014, roč. 39, č. 12, s. 2010-2029. ISSN 0079-6700. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2014.07.003
- [37] FONTANA, J., P. MAŽA, P. IVÁK, M. ŠAJDÍKOVÁ, P. LAVRÍKOVÁ, L. NOVÁKOVÁ, M. PAVELKA a J. TRNKA. *Funkce buněk a lidského těla: Multimediální skriptum se cvičebnicí*. 1.vydání. Praha: 3. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, 2014. 627 s.

- [38] FRANKS, K., I. ABRAHAMMS a J. C. KNOWLES. Development of soluble glasses for biomedical use Part I: In vitro solubility measurement. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2000, roč. 11, č. 609. ISSN 1573-4838. DOI: 10.1023/A:1008949527695
- [39] FREIER, T., C. KUNZE, C. NISCHAN, S. KRAMER, K. STERNBERG, M. SAß, U. T. HOPT a K.-P. SCHMITZ. In vitro and in vivo degradation studies for development of a biodegradable patch based on poly(3-hydroxybutyrate). *Biomaterials*. 2002, roč. 23, č. 13, s. 2649-2657. ISSN 0142-9612. DOI: 10.1016/S0142-9612(01)00405-7
- [40] GUMEL, A. M., M. S. M. ANNUAR a T. HEIDELBERG. Current application of controlled degradation processes in polymer modification and functionalization. *Journal of Applied Polymer Science*. 2013, roč. 129, č. 6, s. 3079-3088. ISSN 0021-8995. DOI: 10.1002/app.39006
- [41] GUO, Z., C. YANG, Z. ZHOU, S. CHEN a F. LI. Characterization of biodegradable poly(lactic acid) porous scaffolds prepared using selective enzymatic degradation for tissue engineering. *RSC Advances*. 2017, roč. 7, č. 54, s. 34063-34070. ISSN 2046-2069. DOI: 10.1039/C7RA03574H
- [42] GUVENDIREN, M., J. MOLDE, R. M. D. SOARES a J. KOHN. Designing biomaterials for 3D printing. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2016, roč. 2, č. 10, s. 1679-1693. ISSN 2373-9878. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.6b00121
- [43] HARA, S., H. TSUJI, Y. OHMOTO, K. AMAKAWA, S. D. HSIEH, Y. ARASE a H. NAKAJIMA. High serum uric acid level and low urine pH as predictors of metabolic syndrome: a retrospective cohort study in a Japanese urban population. *Metabolism*. 2012, roč. 61, č. 2, s. 281-288. ISSN 0026-0495. DOI: 10.1016/j.metabol.2011.06.026
- [44] HE, W. a R. BENSON. Polymeric biomaterials. *Applied Plastics Engineering Handbook*. Elsevier, 2017, s. 145-164. ISBN 9780323390408. DOI: 10.1016/B978-0-323-39040-8.00008-0
- [45] HELEBRANT, A., L. JONÁŠOVÁ, a L. ŠANDA. The influence of simulated body fluid composition on carbonated hydroxyapatite formation. *Ceramics – Silikaty*. 2002, roč. 46, č. 1, s. 9-14. ISSN 0862-5468

- [46] HILDEBRAND, H. F. Biomaterials – a history of 7000 years. *BioNanoMaterials*. 2013, roč. 14, č. 3. ISSN 2193-066X. DOI: 10.1515/bnm-2013-0014
- [47] HLUCHÝ, M. a J. KOLOUCH. *Strojírenská technologie 1*. 4. vydání. Praha: Scientia, 2007. ISBN 978-80-86960-26-5
- [48] HOHLBRUGGER, G. a P. LENTSCH. Intravesical ions, osmolality and pH influence the volume pressure response in the normal rat bladder. *European Urology*. 2017, roč. 11, č. 2, s. 127-130. ISSN 0302-2838. DOI: 10.1159/000472470
- [49] HÖLAND, W., M. SCHWEIGER, R. WATZKE, A. PESCHKE a H. KAPPERT. Ceramics as biomaterials for dental restoration. *Expert Review of Medical Devices*. 2014, roč. 5, č. 6, s. 729-745. ISSN 1743-4440. DOI: 10.1586/17434440.5.6.729
- [50] HOLLISTER, S. J. Scaffold engineering: a bridge to where? *Biofabrication*. 2009, roč. 1, č. 1. ISSN 1758-5082. DOI: 10.1088/1758-5082/1/1/012001
- [51] HUDÁK, R., J. ŽIVČÁK, M. ŠARIK, R. DADEJ a R. RAŠI. 3D Bioprinters – Future of implants biofabrication. *Acta Mechanica Slovaca*. 2013, roč. 17, č. 1, s. 52-59. ISSN 1335-2393. DOI: 10.21496/ams.2013.008
- [52] HUEBSCH, N. a D. J. MOONEY. Inspiration and application in the evolution of biomaterials. *Nature*. 2009, roč. 462, č. 7272, s. 426-432. ISSN 0028-0836. DOI: 10.1038/nature08601
- [53] HUTMACHER, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*. 2000, roč. 21, č. 24, s. 2529-2543. ISSN 0142-9612. DOI: 10.1016/S0142-9612(00)00121-6
- [54] KALITA, N. K., M. K. NAGAR, C. MUDENUR, A. KALAMDHAD a V. KATIIYAR. Biodegradation of modified poly(lactic acid) based biocomposite films under thermophilic composting conditions. *Polymer Testing*. 2019. ISSN 0142-9418. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2019.02.021
- [55] KANNO, T., Y. NARIAI, J. SEKINE, S. SUKEGAWA, H. TATSUMI, Y. FURUKI a H. ISHIBASHI. Surgical treatment of comminuted mandibular fractures using a low-profile locking mandibular reconstruction plate system. *Annals of Maxillofacial Surgery*. 2014, roč. 4, č. 2. ISSN 2231-0746. DOI: 10.4103/2231-0746.147103
- [56] KARAMICHOS, D. a J. HJORTDAL. Keratoconus: Tissue engineering and biomaterials. *Journal of Functional Biomaterials*. 2014, roč. 5, č. 3, s. 111-134. ISSN 2079-4983. DOI: 10.3390/jfb5030111

- [57] KHAING, Z. Z. a CH. E. SCHMIDT. Advances in natural biomaterials for nerve tissue repair. *Neuroscience Letters*. 2012, roč. 519, č. 2, s. 103-114. ISSN 0304-3940. DOI: 10.1016/j.neulet.2012.02.027
- [58] KHAN, F. a M. TANAKA. Designing smart biomaterials for tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, roč. 19, č. 1. ISSN 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms19010017
- [59] KIM, B. S., I. K. PARK, T. HOSHIBA, H. L. JIANG, Y. J. CHOI, T. AKAIKE a CH. S. CHO. Design of artificial extracellular matrices for tissue engineering. *Progress in Polymer Science*. 2011, roč. 36, č. 2, s. 238-268. ISSN 0079-6700. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2010.10.001
- [60] KIM, M., Y.E. CHOE a G.H. KIM. Injectable hierarchical micro/nanofibrous collagen-based scaffolds. *Chemical Engineering Journal*. 2019, roč. 365, s. 220-230. ISSN 1385-8947. DOI: 10.1016/j.cej.2019.02.044
- [61] KIRKPATRICK, C. J. a C. MITTERMAYER. Theoretical and practical aspects of testing potential biomaterialsin vitro. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1990, roč. 1, č. 1, s. 9-13. ISSN 0957-4530. DOI: 10.1007/BF00705347
- [62] KLEBE, R. Cytoscribing: A method for micropositioning cells and the construction of two- and three-dimensional synthetic tissues. *Experimental Cell Research*. 1988, roč. 179, č. 2, s. 362-373. ISSN 0014-4827. DOI: 10.1016/0014-4827(88)90275-3
- [63] KO, H. CH., B. K. MILTHORPE a C. D. MCFARLAND. Engineering thick tissues – the vascularisation problem. *European Cells and Materials*. 2007, roč. 14, č. 1. ISSN1473-2262. DOI: 10.22203/eCM.v014a01
- [64] KOKUBO, T., H. KUSHITANI, S. SAKKA, T. KITSUGI a T. YAMAMURO. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1990, roč. 24, č. 6, s. 721-734. ISSN 0021-9304. DOI: 10.1002/jbm.820240607
- [65] KOUTSKÝ, J. *Biomateriály*. Plzeň: Západočeská univerzita, 1997. ISBN 80-7082-370-4
- [66] KOWALSKI, P. S., CH. BHATTACHARYA, S. AFEWERKI a R. LANGER. Smart biomaterials: Recent advances and future directions. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2018, roč. 4, č. 11, s. 3809-3817. ISSN 2373-9878. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.8b00889

- [67] KRATOCHVÍL, B., V. ŠVORČÍK a D. VOJTĚCH. *Úvod do studia materiálů*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-7080-568-4
- [68] KUCUKGUL, C., S. B. OZLER, I. INCI, E. KARAKAS, S. IRMAK, D. GOZUACIK, A. TARALP a B. KOC. 3D bioprinting of biomimetic aortic vascular constructs with self-supporting cells. *Biotechnology and Bioengineering*. 2015, roč. 112, č. 4, s. 811-821. ISSN 0006-3592. DOI: 10.1002/bit.25493
- [69] LAM, C. X. F., M. M. SAVALANI, S.-H. TEOH a D. W. HUTMACHER. Dynamics of in vitro polymer degradation of polycaprolactone-based scaffolds: accelerated versus simulated physiological conditions. *Biomedical Materials*. 2008, roč. 3, č. 3. ISSN 1748-6041. DOI: 10.1088/1748-6041/3/3/034108
- [70] LAM, C. X., X. MO, S. H. TEOH, a D. W. HUTMACHER. Scaffold development using 3D printing with a starch-based polymer. *Materials Science and Engineering*. 2002, roč. 20, č. 1-2, s. 49-56, ISSN 0928-4931
- [71] LAURENCIN, C. T., K. M. ASHE, N. HENRY, H. M. KAN a K. W. H. LO. Delivery of small molecules for bone regenerative engineering: preclinical studies and potential clinical applications. *Drug Discovery Today*. 2014, roč. 19, č. 6, s. 794-800. ISSN 1359-6446. DOI: 10.1016/j.drudis.2014.01.012
- [72] LEE, A. Y., R. P. ST. ONGE, M. J. PROCTOR, I. M. WALLACE, A. H. NILE, P. A. SPAGNUOLO, Y. JITKOVA, M. GRONDA, Y. WU, M. K. KIM, K. CHEUNG-ONG, N. P. TORRES, E. D. SPEAR, M. K. L. HAN, U. SCHLECH, S. SURESH, G. DUBY, L. E. HEISLER, A. SURENDRA, E. FUNG, M. L. URBANUS, M. GEBBIA, E. LISSINA, M. MIRANDA, J. H. CHIANG, A. M. APARICIO, M. ZEGHOUF, R. W. DAVIS, J. CHERFILS, M. BOUTRY, CH. A. KAISER, C. L. CUMMINS, W. S. TRIMBLE, G. W. BROWN, A. D. SCHIMMER, V. A. BANKAITIS, C. NISLOW, G. D. BADER a G. GIAEVER. Mapping the cellular response to small molecules using chemogenomic fitness signatures. *Science*. 2014, roč. 344, č. 6180, s. 208-211. ISSN 0036-8075. DOI: 10.1126/science.1250217
- [73] LEE, J. T. Y., Y. LENG, K. L. CHOW, F. REN, X. GE, K. WANG a X. LU. Cell culture medium as an alternative to conventional simulated body fluid. *Acta Biomaterialia*. 2011, roč. 7, č. 6, s. 2615-2622. ISSN 1742-7061. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.02.034

- [74] LEE, J.-W., H.-S. HAN, K.-J. HAN, J. PARK, H. JEON, M.-R. OK, H.-K. SEOK, J.-P. AHN, K. E. LEE, D.-H. LEE, S.-J. YANG, S.-Y. CHO, P.-R. CHA, H. KWON, T.-H. NAM, J. H. L. HAN, H.-J. RHO, K.-S. LEE, Y.-CH. KIM a D. MANTOVANI. Long-term clinical study and multiscale analysis of in vivo biodegradation mechanism of Mg alloy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016, roč. 113, č. 3, s. 716-721. ISSN 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.1518238113
- [75] LEE, T. C. a P. NIEDERER. *Basic Engineering for Medics and Biologists: An ESEM Primer*. Washington: IOS Press, 2010. 152 s. ISBN 978-1-60750-527-3
- [76] LEMONS, J. E. Biomaterials, biomechanics, tissue healing, and immediate-function dental implants. *Journal of Oral Implantology*. 2004, roč. 30, č. 5, s. 318-324. ISSN 0160-6972. DOI: 10.1563/0712.1
- [77] LI, M. a J. LI. Biodegradation behavior of silk biomaterials. *Silk Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Elsevier. 2014, s. 330-348. ISBN 9780857096999
- [78] LI, X.-T., J. SUN, S. CHEN a G.-Q. CHEN. In vitro investigation of maleated poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) for its biocompatibility to mouse fibroblast L929 and human microvascular endothelial cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2008, roč. 87A, č. 3, s. 832-842. ISSN 1549-3296. DOI: 10.1002/jbm.a.31890
- [79] LIAO, S. S. a F. Z. CUI. In vitro and in vivo degradation of mineralized collagen-based composite scaffold: Nanohydroxyapatite/collagen/poly(L-lactide). *Tissue Engineering*. 2004, roč. 10, č. 1-2, s. 73-80. ISSN 1076-3279. DOI: 10.1089/107632704322791718
- [80] LIU, L., H. MO, S. WEI a D. RAFTERY. Quantitative analysis of urea in human urine and serum by ¹H nuclear magnetic resonance. *The Analyst*. 2012, roč. 137, č. 3, s. 595-600. ISSN 0003-2654 DOI: 10.1039/C2AN15780B
- [81] LYONS, F. G., A. A. AL-MUNAJJED, S. M. KIERAN, M. E. TONER, C. M. MURPHY, G. P. DUFFY a F. J. O'BRIEN. The healing of bony defects by cell-free collagen-based scaffolds compared to stem cell-seeded tissue engineered constructs. *Biomaterials*. 2010, roč. 31, č. 35, s. 9232-9243. ISSN 01429612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.08.056

- [82] MAALOUF, N. M., M. A. CAMERON, O. W. MOE a K. SAKHAEI. Metabolic basis for low urine pH in type 2 diabetes. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2010, roč. 5, č. 7, s. 1277-1281. ISSN 1555-9041. DOI: 10.2215/CJN.08331109
- [83] MABILIEAU, G. a A. SABOKBAR. In vitro biological test methods to evaluate bioresorbability. *Degradation Rate of Bioresorbable Materials*. Elsevier, 2008, s. 145-160. ISBN 9781845693299. DOI: 10.1533/9781845695033.3.145
- [84] MARTINO, S., F. D'ANGELO, I. ARMENTANO, J.M. KENNY a A. ORLACCHIO. Stem cell-biomaterial interactions for regenerative medicine. *Biotechnology Advances*. 2012, roč. 30, č. 1, s. 338-351. ISSN 0734-9750. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.06.015
- [85] MASOOD, F., M. AZIZ, H. HAIDER, O. SHAKIL, T. YASIN a A. HAMEED. Biodegradation of gamma irradiated poly-3-hydroxybutyrate/sepiolite nanocomposites. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2018, roč. 126, s. 1-9. DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.09.012. ISSN 09648305.
- [86] MOMENI, F., S. M. MEHDI HASSANI, X. LIU a J. NI. A review of 4D printing. *Materials & Design*. 2017, roč. 122, č. 42-79. ISSN 0264-1275. DOI: 10.1016/j.matdes.2017.02.068
- [87] MURPHY, C. M. a F. J. O'BRIEN. Understanding the effect of mean pore size on cell activity in collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *Cell Adhesion & Migration*. 2014, roč. 4, č. 3, s. 377-381. ISSN 1933-6918. DOI: 10.4161/cam.4.3.11747
- [88] MURRAY, P. E., C. G. GODOY a F. G. GODOY. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*. 2007, roč. 12, č.3. ISSN 1698-6946
- [89] NAIR, L. S. a C. T. LAURENCIN. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*. 2007, roč. 32, č. 8, s. 762-798. ISSN 0079-6700. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017
- [90] NAVARRO-BAENA, I., V. SESSINI, F. DOMINICI, L. TORRE, J. M. KENNY a L. PEPONI. Design of biodegradable blends based on PLA and PCL: From morphological, thermal and mechanical studies to shape memory behavior. *Polymer Degradation and Stability*. 2016, roč. 132, s. 97-108. ISSN 0141-3910. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2016.03.037

- [91] NEIS-BEECKMANN, Petra. The body's immune system loosens artificial joints. *BIOPRO Baden-Württemberg*. 2016. Dostupné z: <https://www.gesundheitsindustrie-bw.de/en/article/news/the-bodys-immune-system-loosens-artificial-joints/>
- [92] NEUMANN, R., J. NEUNZEHN, C. HINUEBER, T. FLATH, F. P. SCHULZE a H-P. WIESMANN. 3D-printed poly- ϵ -caprolactone-CaCO₃-biocomposite-scaffolds for hard tissue regeneration. *Express Polymer Letters*. 2019, roč. 13, č. 1, s. 2-17. ISSN 1788-618X. DOI: 10.3144/expresspolymlett.2019.2
- [93] O'BRIEN, F. J., B. A. HARLEY, I. V. YANNAS a L. J. GIBSON. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials*. 2005, roč. 26, č. 4, s. 433-441. ISSN 0142-9612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.02.052
- [94] O'BRIEN, F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*. 2011, roč. 14, č. 3, s. 88-95. ISSN 1369-7021. DOI: 10.1016/S1369-7021(11)70058-X
- [95] ONG, K., S. LOVALD a J. BLACK. *Orthopaedic Biomaterials in Research and Practice, Second Edition*. CRC Press, 2014. ISBN 978-1-4665-0350-2. DOI: 10.1201/b16369
- [96] ONUKI, Y., U. BHARDWAJ, F. PAPADIMITRAKOPOULOS a D.J. BURGESS. A Review of the biocompatibility of implantable devices: Current challenges to overcome foreign body response. *Journal of Diabetes Science and Technology*. 2008, roč. 2, č. 6, s. 1003-1015. ISSN 1932-2968. DOI: 10.1177/193229680800200610
- [97] ORIŇAKOVÁ, R., A. ORIŇAK, M. KUPKOVÁ, M. HRUBOVČÁKOVÁ, L. M. BUČKOVÁ, M. GIRETOVÁ, L'. MEDVECKÝ, D. DOBROČKA, O. PATRUŠ a F. KAL'AVSKÝ. In vitro degradation and cytotoxicity evaluation of iron biomaterials with hydroxyapatite film. *International Journal of Electrochemical Science*. 2015, roč. 10, s. 8158–8174. ISSN 1452-3981
- [98] PAN, R. a T. CRISPIN. A hierarchical modeling approach to accelerated degradation testing data analysis: A case study. *Quality and Reliability Engineering International*. 2011, roč. 27, č. 2, s. 229-237. ISSN 0748-8017. DOI: 10.1002/qre.1100
- [99] PARK, J. B. a R. S. LAKES. *Biomaterials: an introduction*. 3rd ed. New York: Springer, 2007. ISBN 978-0-387-37879-4

- [100] PARK, J. B. *Biomaterials Science and Engineering*. Boston: Springer US, 1984. ISBN 978-1-4612-9710-9
- [101] PATI, F., J. JANG, D.-H. HA, S. WON KIM, J.-W. RHIE, J.-H. SHIM, D.-H. KIM a D.-W. CHO. Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. *Nature Communications*. 2014, roč. 5, č. 1. ISSN 2041-1723. DOI: 10.1038/ncomms4935
- [102] PATTANASUTTICHONLAKUL, W., N. SOMBATSOMPOP a B. PRAPAGDEE. Accelerating biodegradation of PLA using microbial consortium from dairy wastewater sludge combined with PLA-degrading bacterium. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2018, roč. 132, s. 74-83. ISSN 0964-8305. DOI: 10.1016/j.ibiod.2018.05.014
- [103] PÉREZ, R. A., J. E. WON, J. C. KNOWLES a H. W. KIM. Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013, roč. 65, č. 4, s. 471-496. ISSN 0169-409X. DOI: 10.1016/j.addr.2012.03.009
- [104] PHELPS, E. A. a A. J. GARCIA. Update on therapeutic vascularization strategies. *Regenerative Medicine*. 2009, roč. 4, č. 1, s. 65-80. ISSN 1746-0751. DOI: 10.2217/17460751.4.1.65
- [105] PING, D. Review on ω phase in body-centered cubic metals and alloys. *Acta Metallurgica Sinica (English Letters)*. 2014, roč. 27, č. 1, s. 1-11. ISSN 1006-7191. DOI: 10.1007/s40195-013-0014-2
- [106] PROCTOR, R. A. Toward an understanding of biomaterial infections: A complex interplay between the host and bacteria. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 2000, roč. 135, č. 1, s. 14-15. ISSN 0022-2143. DOI: 10.1016/S0022-2143(00)70015-1
- [107] QIU, Y. a J. Z. DUAN. *In vitro/in vivo correlations: Developing Solid Oral Dosage Forms*. Elsevier, 2017, s. 415-452. ISBN 9780128024478
- [108] RABKIN, E. a F. J. SCHOEN. Cardiovascular tissue engineering. *Cardiovascular Pathology*. 2002, roč. 11, č. 6, s. 305-317. ISSN 1054-8807. DOI: 10.1016/S1054-8807(02)00130-8

- [109] RATNER, B. D., A. S. HOFFMAN, F. J. SCHOEN a J. E. LEMONS. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. 2nd ed. Boston: Elsevier Academic Press, 2004. ISBN 0125824637
- [110] RIVAS, D., A. GINEBREDÁ, S. PÉREZ, C. QUERO a D. BARCELÓ. MALDI-TOF MS Imaging evidences spatial differences in the degradation of solid polycaprolactone diol in water under aerobic and denitrifying conditions. *Science of The Total Environment*. 2016, roč. 566, s. 27-33. ISSN 0048-9697. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.05.090
- [111] SAAD, B. a U. W. SUTER. Biodegradable polymeric materials. *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*. Elsevier. 2001, s. 551-555. ISBN 9780080431529. DOI: 10.1016/B0-08-043152-6/00105-4
- [112] SAATKAMP, C. J., M. L. DE ALMEIDA, J. A. M. BISPO, A. L. B. PINHEIRO, A. B. FERNANDES a L. SILVEIRA. Quantifying creatinine and urea in human urine through Raman spectroscopy aiming at diagnosis of kidney disease. *Journal of Biomedical Optics*. 2016, roč. 21, č. 3. ISSN 1083-3668. DOI: 10.1117/1.JBO.21.3.037001
- [113] SAVENKOVA, L, Z GERBERGA, V NIKOLAEVA, A DZENE, I BIBERS a M KALNIN. Mechanical properties and biodegradation characteristics of PHB-based films. *Process Biochemistry*. 2000, roč. 35, č. 6, s. 573-579. ISSN 1359-5113. DOI: 10.1016/S0032-9592(99)00107-7
- [114] SCHILLE, C., M. BRAUN, H. P. WENDEL, L. SCHEIDELER, N. HORT, H.-P. REICHEL, E. SCHWEIZER a J. GEIS-GERSTORFER. Corrosion of experimental magnesium alloys in blood and PBS: A gravimetric and microscopic evaluation. *Materials Science and Engineering*. 2011, roč. 176, č. 20, s. 1797-1801. ISSN 09215107. DOI: 10.1016/j.mseb.2011.04.007
- [115] SENN, N. A new method of direct fixation of the fragments in compound and ununited fractures. *Annals of Surgery*. 1893. roč. 18, č. 2, s. 125–151. PMC1493132. PMID 17859953
- [116] SHELDON, R. A. Green and sustainable manufacture of chemicals from biomass: state of the art. *Green Chem*. 2014, roč. 16, č. 3, s. 950-963. ISSN 1463-9262. DOI: 10.1039/C3GC41935E

- [117] ŠIMŮNEK, A. *Dentální implantologie*. 1. vydání Hradec Králové: Nucleus HK, 2008. 296s. ISBN 978-808-7009-307
- [118] SRIDHAR, T. M. a S. RAJESWARI. Biomaterials corrosion. *Corrosion Reviews*. 2009, roč. 27. ISSN 2191-0316. DOI: 10.1515/CORRREV.2009.27.S1.287
- [119] STAGNER, J. Methane generation from anaerobic digestion of biodegradable plastics – a review. *International Journal of Environmental Studies*. 2016, roč. 73, č. 3, s. 462-468. ISSN 0020-7233. DOI: 10.1080/00207233.2015.1108607
- [120] SUN, Q., B. QIAN, K. UTO, J. CHEN, X. LIU a T. MINARI. Functional biomaterials towards flexible electronics and sensors. *Biosensors and Bioelectronics*. 2018, roč. 119, s. 237-251. ISSN 0956-5663. DOI: 10.1016/j.bios.2018.08.018
- [121] TCTMAGAZINE. Stroke patient gets life back with 3D printed cranial implant from EOS. *TCTmagazine: The magazine for Design-to-Manufacturing Innovation*. 2015. Dostupné z: <https://www.tctmagazine.com/3d-printing-news/Stroke-patient-gets-life-back-with-3D-printed-cranial-implant-from-EOS>
- [122] UNITED NATIONS STATISTICS DIVISION. *Glossary of Environment Statistics*. New York: United Nations, 1997. 83 s. Studies in methods. ISBN 92-1-161386-8
- [123] VOJTOVA, L., L. MICHLOVSKA, K. VALOVA, M. ZBONČÁK, M. TRUNEC, K. ČÁSTKOVÁ, M. KRTIČKA, V. PAVLIŇÁKOVÁ, P. POLÁČEK, M. DZUROV, V. LUKÁŠOVÁ, M. RAMPICHOVÁ, T. SUCHÝ, R. SEDLÁČEK a M.-P. GINEBRA, E. B. MONTUFAR JIMENEZ. The Effect of the thermosensitive biodegradable PLGA-PEG-PLGA copolymer on the rheological, structural and mechanical properties of thixotropic self-hardening tricalcium phosphate cement. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, roč. 20, č. 2. ISSN 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms20020391
- [124] WALLACH-KLOSKI, L. a N. KLOSKI. *Začínáme s 3D tiskem: Praktická příručka k hardwaru i softwaru k ovládnutí 3D tisku*. Computer Press, 2017. 216 s. ISBN 978-80-251-4876-1
- [125] WEBSTER, J.G. *Encyclopedia of medical devices and instrumentation*. 2nd ed. Hoboken: Wiley-Interscience, 2006. ISBN 978-0-471-26358-6
- [126] WILLIAMS, D. F. *Definitions in Biomaterials: Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials*. Chester, 1986. ISBN 0444428585

- [127] WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 2008, roč. 29, č. 20, s. 2941-2953. ISSN 0142-9612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.04.023
- [128] WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterials. *Biomaterials*. 2009, roč. 30, č. 30, s. 5897-5909. ISSN 0142-9612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.07.027
- [129] WILLIAMS, D. F. The biomaterials conundrum in tissue engineering. *Tissue Engineering Part A*. 2014, roč. 20, č. 7, s. 1129-1131. ISSN 1937-3341. DOI: 10.1089/ten.tea.2013.0769
- [130] WILLIAMS, D. F. *The Williams dictionary of biomaterials*. Liverpool: Liverpool University Press, 1999. ISBN 0853237344
- [131] WU, L. a J. DING. In vitro degradation of three-dimensional porous poly(d,l-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. 2004, roč. 25, č. 27, s. 5821-5830. ISSN 0142-9612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.01.038
- [132] ZHANG, L., C. XIONG a X. DENG. Biodegradable polyester blends for biomedical application. *Journal of Applied Polymer Science*. 1995, roč. 56, č. 1, s. 103-112. ISSN 00218995. DOI: 10.1002/app.1995.070560114
- [133] ZHANG, R. a P. X. MA. Biomimetic polymer/apatite composite scaffolds for mineralized tissue engineering. *Macromolecular Bioscience*. 2004, roč. 4, č. 2, s. 100-111. ISSN 1616-5187. DOI: 10.1002/mabi.200300017
- [134] ZHAO, X. a M. XIE. Using accelerated life tests data to predict warranty cost under imperfect repair. *Computers & Industrial Engineering*. 2017, roč. 107, s. 223-234. ISSN 0360-8352. DOI: 10.1016/j.cie.2017.03.021
- [135] ZHAO, X., J. XU a B. LIU. Accelerated degradation tests planning with competing failure modes. *IEEE Transactions on Reliability*. 2018, roč. 67, č. 1, s. 142-155. ISSN 0018-9529. DOI: 10.1109/TR.2017.2761025
- [136] ZHENG, Y. F., X. N. GU a F. WITTE. Biodegradable metals. *Materials Science and Engineering: R: Reports*. 2014, roč. 77, s. 1-34. ISSN 0927-796X. DOI: 10.1016/j.mser.2014.01.001
- [137] ZHONG, Y. a R. V BELLAMKONDA. Biomaterials for the central nervous system. *Journal of The Royal Society Interface*. 2008, roč. 5, č. 26, s. 957-975. ISSN 1742-5689. DOI: 10.1098/rsif.2008.0071

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADT	ang. <i>Accelerated Degradation Tests</i> , zrychlené testy degradace
ALP	alkalické fosfatázy
ATBC.....	acetyl tributylcitrát
BM	ang. <i>Biodegradable Metals</i> , biodegradabilní kovy
BSED	ang. <i>Back Scattered Electron Diffraction</i> , detektor zpětně odražených elektronů
COL	kolagen
ECM.....	extracelulární matrice
FDA	ang. <i>Food and Drug Administration</i> , Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv
GA.....	glutaraldehyd (pentadial)
HBSS	ang. <i>Hank's Balanced Salt Solution</i> , Hankovo solné médium
CHI.....	chitosan
<i>in situ</i>	lat. v místě, v přirozené poloze
<i>in vitro</i>	lat. „ve skle“ tj. ve zkumavce za umělých laboratorních podmínek
<i>in vivo</i>	lat. „v živém“ organismu lidském nebo zvířecím
LFD	ang. <i>Large-field Detector</i> , detektor sekundárních elektronů
MEF	embryonální fibroblasty myši (embryonální kmenové buňky myši)
MSM	ang. <i>Mineral Salt Medium</i> , minerální solné médium
MTT	tetrazoliová sůl; (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid)
OLA	oligomer kyseliny mléčné
PBS	ang. <i>Phosphate Buffered Saline</i> , fosfátový pufr
PCL	polykaprolakton
PHA	polyxydroxyalkanoáty
PHB.....	polyhydroxybutyrát
PLA	kyselina polymléčná
RPM.....	ang. <i>Revolutions per Minute</i> , otáčky za minutu
SEM	ang. <i>Scanning Electron Microscope</i> , skenovací elektronový mikroskop
SP	sepiolit, minerál příbuzný mastku (označován jako mořská pěna)
TAC	triacetin (glycerolester kyseliny octové)
THAM.....	trisaminomethan, pufrový roztok
USP	ang. <i>United States Pharmacopeia</i>
UVC	ultrafialové záření typu C (krátkovlnné záření o vlnové délce <280 nm)

9 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Jedna z nejstarších dochovaných náhrad, tzv. Káhirský palec	3
Obr. 2: Sennova dutá perforovaná intra-kostní dlaha.....	5
Obr. 3: Požadavky na vlastnosti implantátu	6
Obr. 4: Použití korneálního implantátu při keratoplastice	11
Obr. 5: Schéma využití implantátů v medicíně	14
Obr. 6: Keramické dentální implantáty	17
Obr. 7: Využití kovových implantátů k rekonstrukci mandibuly.....	17
Obr. 8: Kraniální implantát pro pacienta po mozkové mrtvici.....	18
Obr. 9: Proces tvorby implantátu	19
Obr. 10: 3D model mozkového a maxilárního nádoru.....	20
Obr. 11: Výroba buněčných 3D matic z bioinkoustů.....	22
Obr. 12: Bioprinting budoucnosti – 4D tisk funkčního srdce z lidských buněk	23
Obr. 13: Hojení vřetenní kosti a degradace šroubu z Mg slitiny.....	24
Obr. 14: Odmítnutí implantátu dolní končetiny	27
Obr. 15: Mechanické vlastnosti implantátu.....	28
Obr. 16: Srovnání <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i> testů	33
Obr. 17: Laboratorium aditivních biomedicínských procesů	36
Obr. 18: Uživatelské rozhraní Visual Machines pro nastavení tiskových parametrů	37
Obr. 19: Laboratoř JA418/419 Katedry environmentálního inženýrství	38
Obr. 20: Granulát PLA/PHB	39
Obr. 21: 3D Scaffold ze směsí PLA/PHB	40
Obr. 22: Sušení a vážení vzorků.....	40
Obr. 23: Rozměry 3D scaffoldů z PLA/PHB	41
Obr. 24: 3D tisk směsí PLA/PHB	42

Obr. 25: Scaffoldy ze směsí PLA/PHB	42
Obr. 26: Proces úpravy pH médií	43
Obr. 27: Označování vzorků v Petriho miskách a Erlenmeyerových baňkách	44
Obr. 28: Inkubace vzorků a médií v termostatu během akcelerované degradace	45
Obr. 29: Přirozená degradace v močovině (inkubátor s magnetickou míchačkou)....	46
Obr. 30: Přirozená degradace ve fyziologickém roztoku (inkubátor se třepačkou)...	46
Obr. 31: Postupový metodický diagram.....	47
Obr. 32: Analýza vzorků pomocí SEM	48
Obr. 33: Rozdíl mezi nedegradovaným a degradovaným vzorkem	49
Obr. 34: Fotografie chybně vytištěných scaffoldů	49
Obr. 35: Rozdíly mezi vzorky se zvětšení 20x.....	57
Obr. 36: Mikroskopické fotografie scaffoldů.....	57
Obr. 37: Srovnání vzorků před a po biodegradaci pomocí SEM	58
Obr. 38: Pozorování pomocí SEM v módu BSED a LFD.....	59
Obr. 39: Tepelná degradace PLA/PHB	59
Obr. 40: Projevy biodegradace	60
Obr. 41: Růst krystalů NaCl	60

10 SEZNAM TABULEK A GRAFŮ

Tab. 1: Historicky významné objevy s využitím biomateriálů	4
Tab. 2: Požadavky na funkční vlastnosti implantátů.....	7
Tab. 3: Rozdělení biomateriálů dle interakce s živou tkání organismu	8
Tab. 4: Kategorie materiálů využívaných v lidském těle	13
Tab. 5: Biodegradační metody	31
Tab. 6: Seznam použitých přístrojů a materiálu pro přirozenou biodegradaci	37
Tab. 7: Seznam použitých přístrojů a materiálu pro akcelerovanou degradaci.....	38
Tab. 8: Nastavení tiskových parametrů	41
Tab. 9: Hmotnosti jednotlivých vzorků v g.....	50
Tab. 10: Akcelerovaná biodegradace v močovině a moči.....	50
Tab. 11: Přirozená biodegradace v močovině	53
Tab. 12: Přirozená biodegradace ve fyziologickém roztoku	53
 Graf 1: Srovnání ADT u vzorků PLA/PHB v močovině a moči.....	51
Graf 2: Hmotnostní úbytek PLA/PHB (0 % TAC) v močovině.....	54
Graf 3: Hmotnostní úbytek PLA/PHB (0 % TAC) ve fyziologickém roztoku	54
Graf 4: Hmotnostní úbytek PLA/PHB (5 % TAC) v močovině.....	55
Graf 5: Hmotnostní úbytek PLA/PHB (5 % TAC) ve fyziologickém roztoku	55
Graf 6: Hmotnostní úbytek PLA/PHB (10 % TAC) v močovině.....	56
Graf 7: Hmotnostní úbytek PLA/PHB (10 % TAC) ve fyziologickém roztoku	56